



Titre: Développement de revêtements polymériques bioactifs pour
prothèses vasculaires synthétiques

Auteur: Samantha Noël
Author:

Date: 2015

Type: Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

Référence: Noël, S. (2015). Développement de revêtements polymériques bioactifs pour
prothèses vasculaires synthétiques [Thèse de doctorat, École Polytechnique de
Montréal]. PolyPublie. <https://publications.polymtl.ca/1844/>
Citation:

 **Document en libre accès dans PolyPublie**
Open Access document in PolyPublie

URL de PolyPublie: <https://publications.polymtl.ca/1844/>
PolyPublie URL:

**Directeurs de
recherche:** Gregory De Crescenzo
Advisors:

Programme: Génie biomédical
Program:

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

DÉVELOPPEMENT DE REVÊTEMENTS POLYMÉRIQUES BIOACTIFS
POUR PROTHÈSES VASCULAIRES SYNTHÉTIQUES

SAMANTHA NOËL

INSTITUT DE GÉNIE BIOMÉDICAL
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

THÈSE PRÉSENTÉE EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLÔME DE PHILOSOPHIAE DOCTOR
(GÉNIE BIOMÉDICAL)

AOÛT 2015

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Cette thèse intitulée :

DÉVELOPPEMENT DE REVÊTEMENTS POLYMÉRIQUES BIOACTIFS
POUR PROTHÈSES VASCULAIRES SYNTHÉTIQUES

présentée par : NOËL Samantha

en vue de l'obtention du diplôme de : Philosophiae Doctor

a été dûment acceptée par le jury d'examen constitué de :

M. HENRY Olivier, Ph. D., président

M. DE CRESCENZO Gregory, Ph. D., membre et directeur de recherche

M. VIRGILIO Nick, Ph. D., membre

Mme FAUCHEUX Nathalie, Ph. D., membre externe

DÉDICACE

Au 2086

REMERCIEMENTS

En premier lieu, je tiens à remercier de tout cœur Grégory De Crescenzo, pour ta supervision exemplaire et ton soutien quotidien, pour ton positivisme à toutes épreuves et tes encouragements permanents, pour tout ce que tu as appris scientifiquement et donné humainement à la petite fille que je suis. J'espère avoir mérité la confiance que tu m'as accordée et que j'ai pu rendre fier le père que tu as été.

Comme le doctorat est un long chemin semé d'embûches, je remercie mes vaillants partenaires du bureau 2086 : Fred pour tout ce que moi et bien d'autres dans le labo n'aurions pas pu réaliser sans ton aide, soutien et conseils ; Pauline mon éternelle compagne de galères, humaines et scientifiques ; Ben pour ton humour pince-sans-rire et tes connaissances en chimie ; Massi pour ton ouverture d'esprit et pour notre amour partagé des équations ; Éric pour tes talents de siffleur et nos échanges sur les carrières en industrie ; Olga pour ta franchise et ton amitié ; Cyril pour ton enthousiasme légendaire et ta vivacité scientifique.

Je n'oublie pas non plus tous les autres au bout du couloir, avec qui j'ai pu échanger au laboratoire ou autour du lunch : Merci à Cécile, Edwige, Florian, July, Kahina, Nesrine, Xiaoje, Xinhe ; ni les chanceux ayant déjà gradué : Cyril, Pei Lian, Inès, Alex, Claudia, P.O., Atefeh, Zahra, Cédric, Julien et Charles. Merci également à nos stagiaires, en particulier Guillaume le battant, Aldo l'assidu et Antoine le dynamique ; et nos techniciens : Merci à Yuan et Jingkui. Un grand merci aux sourires de Christian et Savario à l'accueil, toujours prêts à rendre service et à partager leur bonne humeur sans compter.

Merci aux gens avec qui j'ai pu collaborer de près ou de loin durant ces quelques années : Laurent pour ta confiance et tes recommandations ; Ahmed, Louis, et Yahye à l'ICM, Alvaro et Maria au CNRC-Ottawa ; Nathalie, Manon, Martin et Lucie au CNRC-Boucherville ; Sophie et Marion au CR-CHUM ; David au sein du CBS-MC. Je tiens à souligner l'excellence de l'enseignement donné par certains profs qui m'ont marquée et que l'on prend malheureusement rarement le temps de remercier, en particulier Caroline Boudoux, Gregory De Crescenzo, Michel Meunier et Phillippe Leclerc.

Ce passage à Montréal a également été l'occasion de créer des liens d'amitiés en dehors du bureau avec des personnes enrichissantes qui me manqueront et avec qui je m'efforcerai de garder contact : Richard ; Pierre et Gabrielle ; Rémy et David ; la gang de l'IRB en particulier Adeline, Benjamin,

Céline, Elodie, Florian, Laurence, Igor ; Nicolas. Ce n'est pas sans omettre le soutien apporté par les amis de longue date de *là-bas*, en particulier ceux qui ont osé voler jusqu'à moi : Antoine, Antonin, Benoît, Chloé, Christel, Christophe, Corentin, Esther, Maxime, Pauline, Valentin (les deux!) ; ni celui apporté par ma famille : Maman, Yoann, Aurélie, Sophie, Mémé, Sébastien et Myriam ; ainsi que ma belle-famille : Pierre, Françoise et Michel, Marie-Josée et René.

Pour revenir de ce côté de l'Atlantique, un grand merci et un gros câlin à mes deux compères de voyage sans qui cette aventure n'aurait pas été la même : Fred, mon ami, mon frère, merci pour tous les bons moments riches en émotions, rigolades et/ou larmes, j'espère qu'on aura l'occasion d'en recréer dans un futur proche. En attendant, je te souhaite le meilleur pour la fin de ton séjour et l'obtention de ton doctorat plus que mérité. Dr. Charles, mon tout, mon modèle, tu m'impressionnes, m'inspires et le challenge de t'égaler m'a tirée vers le haut pendant tout le doc. Sans toi rien de tout ça n'aurait été possible, heureusement tu ne vas pas me manquer 😊 !

Pour terminer sur une note de fraîcheur, je ferai un petit clin d'œil à la relève, les enfants du labo : Anna, Thelma, Salma, Jeanne, Louise et Olivier !

RÉSUMÉ

Depuis plus de 60 ans, le développement de prothèses vasculaires de petit diamètre est un défi majeur dans le domaine de la recherche vasculaire. Au travers de ces recherches, il est rapidement apparu que l'interface idéale sang-matériau restait l'endothélium natif. Par conséquent, l'ingénierie tissulaire est devenue incontournable au développement de prothèses vasculaires performantes, via l'imitation des fonctions de l'endothélium ou des processus d'angiogenèse permettant l'endothélialisation des implants. D'une part, l'analyse des échecs des prothèses a permis l'identification de fonctions-clés de l'endothélium empêchant la sténose, à savoir la régulation de coagulation, limitant la thrombose, et le maintien de l'équilibre avec les cellules environnantes à travers l'inhibition de l'hyperplasie des cellules musculaires lisses. D'autre part, les avancées dans la compréhension des phénomènes biologiques impliqués dans l'angiogenèse permettent de mieux appréhender la façon dont la matrice extracellulaire (ECM) - et les nombreuses protéines qu'elle séquestre – influent sur l'adhésion, la migration et la prolifération des cellules endothéliales. À partir de ces recherches, nous avons développé des revêtements intelligents présentant les fonctions-clés de l'endothélium ainsi que des facteurs d'adhésion et de prolifération inspirés de l'ECM afin de permettre le recrutement et la croissance sélective des cellules endothéliales au sein de prothèses vasculaires synthétiques.

En amont de ce projet de thèse, des structures non-tissées de polyéthylène téréphtalate (PET) ont été développées par une équipe partenaire pour former des prothèses synthétiques aux propriétés mécaniques adéquates, afin de pallier aux limites des prothèses de petit diamètre actuelles. Ces structures innovantes sont le substrat de départ utilisé pour le développement de notre revêtement bioactif. Etant donné que (i) les propriétés mécaniques, en particulier la compliance, étaient au centre de la conception de ces structures et que (ii) le PET est un matériau inerte, nous avons développé dans un premier temps une méthode chimique douce pour fonctionnaliser ces structures tout en conservant leur compliance. Cette étude constitue notre premier manuscrit, publié dans *Journal of Materials Chemistry B* (cf. Chapitre 4). En bref, le polyvinylamine (PVAm) a été utilisé en tant qu'agent d'aminolyse du PET dans l'hypothèse qu'il n'affecterait pas les propriétés volumiques des structures de PET, tout en apportant des groupements amines nécessaires aux modifications ultérieures. Ayant pour objectif d'obtenir un recrutement et une croissance sélective des cellules endothéliales sur ces structures aminées, nous avons dotés nos revêtements bioactifs de propriétés anti-adhésives (*low-fouling*). Dans ce contexte, le polyéthylène glycol (PEG) et le

dextrane ont été utilisés pour empêcher l'adhésion des cellules, des protéines et des plaquettes, et ainsi fournir une base bio-inerte au revêtement. A partir de là, des peptides et protéines naturels sélectionnés dans la littérature ont été immobilisés au moyen de stratégies assurant la spécificité du site de greffage, ainsi que l'orientation et la stabilité requises pour la bioactivité et les fonctions de la biomolécule capturée. Ces caractéristiques sont aisément obtenues lors du greffage covalent de séquences peptidiques courtes. L'immobilisation de protéines est cependant plus délicate et une capture basée sur des étiquettes peptidiques a été implémentée avec le système d'hélices à haute affinité E5/K5. Tout au long du développement des revêtements, la caractérisation détaillée ainsi que le contrôle des densités greffées ont fait l'objet d'un suivi attentif.

Notre second manuscrit publié dans *Biomacromolecules* (cf. Chapitre 5) se concentrait sur l'adhésion sélective des cellules endothéliales (EC) vis-à-vis des plaquettes. Dans ce rapport, nous avons exploré la combinaison du polyéthylène glycol (PEG) anti-adhésif et de peptides d'adhésion – à savoir RGD, YIGSR et REDV – greffés sur des films de PET fonctionnalisés avec le PVAm. La couche dense de PEG obtenue a permis le greffage subséquent de peptides sur une large gamme de densité (de 20 à 2 000 pmol/cm² environ). Les performances du revêtement ont été évaluées en termes d'adhésion des EC, d'adhésion plaquettaire et d'adsorption de protéines. Toutes étaient initialement inhibées par le revêtement de PEG. Le peptide RGD a présenté les propriétés adhésives attendues, tant pour les EC que pour les plaquettes. REDV n'a favorisé ni l'adhésion plaquettaire, tel qu'attendu, ni l'adhésion des EC, en contradiction avec d'autres études. Malgré une légère thrombogénicité, YIGSR s'est avéré la séquence la plus prometteuse, a été sélectionnée pour la suite de nos travaux en combinaison avec d'autres agents anti-thrombogènes.

Par conséquent, dans notre troisième manuscrit soumis dans *Biomaterials* (cf. Chapitre 6), nous sommes passés du PEG au dextrane, en espérant révéler le potentiel de YIGSR et/ou REDV tout en améliorant les propriétés anti-adhésives de notre revêtement de façon économique. Le dextrane ne présentant pas de groupements réactifs adéquats, il a tout d'abord été modifié avec des fonctions vinylsulfone (VS) sélectionnées pour leur polyvalence et leur stabilité. Une bibliothèque de dextrane-VS a ainsi été produite, greffée sur des substrats aminés et caractérisée en termes de degrés de modification (% VS), propriétés anti-adhésives et capacité à recruter des peptides. Ce rapport se concentrait sur une seconde complication des prothèses vasculaires : la surcroissance des cellules musculaires lisses (SMC). Bien que la thrombogénicité n'ait pas été testée en tant que telle, le revêtement de dextrane a permis d'inhiber efficacement l'adhésion des EC et des SMC,

indiquant de fortes propriétés anti-adhésives. Des peptides d'adhésion ainsi que le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) ont été co-immobilisés sur le meilleur dextrane-VS (%VS = environ 50% des unités saccharides). Bien que RGD et YIGSR favorisaient l'adhésion cellulaire, aucun des peptides testés – à savoir RGD, YIGSR, REDV et CAG – ne s'est avéré sélectif aux EC vis-à-vis des SMC. Néanmoins, RGD et VEGF ont pu être efficacement immobilisés à de fortes densités (environ 1 nmol/cm² et 50 fmol/cm², respectivement), et ont permis d'améliorer à la fois l'adhésion des EC et leur prolifération. Cette dernière était aussi forte qu'en présence de VEGF soluble, et était sélective aux EC vis-à-vis des SMC. Dans l'ensemble, de multiples biomolécules ont pu être incorporées à notre revêtement de dextrane-VS, tout en conservant leur bioactivité respective.

En conclusion, cette thèse fournit des résultats instructifs sur les revêtements multifonctionnels, disposant notamment de propriétés anti-adhésives (*low-fouling*) et présentant des facteurs adhésifs et prolifératifs, qui pourraient trouver de nombreuses applications en ingénierie tissulaire et en médecine régénératrice. Nous avons souligné l'importance de la sélectivité et de la caractérisation des revêtements, deux paramètres qui devraient être considérés avec attention lors de la modification de surface de substituts vasculaires.

ABSTRACT

The development of small-diameter vascular grafts has been referred to as the quest for the Holy Grail in the vascular field for more than 60 years now. As research on such devices was growing, it soon became clear that the ideal blood-contacting interface remains the native endothelium. Accordingly, tissue engineering is required to develop effective vascular prostheses, through mimicking either the endothelium functions or the natural angiogenic processes leading to graft endothelialization. On the one hand, analyses of graft failures have helped identifying key functions of endothelial cells that prevent stenosis: those are the regulation of coagulation, avoiding thrombosis, and the control over neighboring cells, inhibiting smooth muscle cell hyperplasia. On the other hand, advances in angiogenesis biology have yielded insights into how the extracellular matrix (ECM) itself – as well as the numerous signaling molecules it sequesters – can affect endothelial cell adhesion, migration and proliferation. Building on those researches, we developed smart coatings, combining key features of the endothelium as well as ECM adhesive and proliferative cues for selective endothelial cell recruitment and growth within synthetic vascular grafts.

Prior to this thesis project, polyethylene terephthalate (PET) non-woven structures were developed by a partner team as novel vascular grafts featuring appropriate mechanical properties. The latter being one of the drawbacks for small-diameter synthetic prostheses. We used those structures as a starting substrate to develop our bioactive coating. Considering that (i) mechanical properties, more specifically compliance, was a primary concern in the graft design and (ii) PET was an inert material, we first developed a non-damaging chemical method to provide those PET structures with reactive moieties while preserving the structure compliance. That study founded our first manuscript published in the *Journal of Materials Chemistry B* (Chapter 4). Briefly, polyvinylamine (PVAm) was used as a PET aminolysis reagent, assuming it would not affect the bulk properties of the PET structures while providing amino groups for subsequent surface biomodification.

Aiming at the selective recruitment and growth of endothelial cells on those aminated surfaces, low-fouling components were included within our bioactive coatings. In that endeavor, polyethylene glycol (PEG) and dextran were used to repel cells, proteins and platelets, thereby yielding a bio-inert background. From there, natural peptides and proteins selected from the literature were then grafted through immobilization strategies featuring site-specificity, orientation

and stability, required to preserve the tethered biomolecule activity and functions. Those features are quite easily obtained through the covalent grafting of short peptide sequences. Protein immobilization however is more challenging and an adequate tag-mediated capture was thus implemented with the E5/K5 coiled-coil system. Throughout the coating developments, an in-depth characterization as well as a control over surface densities were considered major concerns.

Our second manuscript published in *Biomacromolecules* (Chapter 5) focused on the selective adhesion of endothelial cells (EC) over platelets. In this report, we explored the combination of low-fouling polyethylene glycol (PEG) and adhesion peptides – namely RGD, YIGSR, and REDV – grafted on top of PVAm-coated PET films. The peptides were grafted over a wide range of density (about 20 to 2 000 pmol/cm²) on top of a dense PEG underlayer. The coating performances were assessed through EC adhesion, platelet attachment and protein adsorption, which were all drastically diminished on PEG-coated substrates. RGD exhibited the expected high adhesive properties, towards both EC and platelets. REDV had no effect on platelet attachment, as expected, or on EC adhesion, in contrast with previous reports. Finally, YIGSR was the most promising sequence even though its combination with other agents should be explored to further decrease thrombogenicity for vascular graft applications.

Accordingly, in our third manuscript (Chapter 6), we switched from PEG to dextran, hoping to unravel the potential of YIGSR and/or REDV as well as improve the low-fouling properties of our coating, in a cost-effective manner. As dextran is devoid of reactive moieties, it was first modified with vinylsulfone (VS) functions, selected for its versatility and stability. Accordingly, a library of dextran-VS was produced, grafted to aminated substrates and characterized in terms of degree of VS modification (%VS), cell-repelling properties and potential for peptide grafting. This report was focused on a second issue: the over-proliferation of smooth muscle cells (SMC). Although thrombogenicity was not tested *per se*, the dextran coating effectively inhibited both EC and SMC adhesion, indicating its low-fouling properties. ECM peptides as well as vascular endothelial growth factor (VEGF) were co-immobilized on the most suitable dextran-VS coating (%VS = *ca.* 50% of saccharide units). While RGD and YIGSR were able to restore cell adhesion, none of the tested adhesive peptides – namely RGD, YIGSR, REDV and CAG – proved selective towards EC over SMC. Nevertheless, both RGD and VEGF were efficiently tethered at high densities (*ca.* 1 nmol/cm² and 50 fmol/cm², respectively), and were able to promote EC adhesion as well as proliferation. The latter was enhanced to the same extent as with soluble VEGF and proved

selective to EC over SMC. Altogether, multiple biomolecules could be efficiently incorporated into a dextran-VS construct, while maintaining their respective bioactivity.

In conclusion, this thesis provides insightful results on multifunctional coatings featuring low-fouling properties as well as both adhesive and proliferative cues, which could find many applications in tissue engineering and regenerative medicine. We emphasized on the importance of selectivity and characterization, which should be carefully considered in the surface design of vascular substitutes.

TABLE DES MATIÈRES

DÉDICACE.....	III
REMERCIEMENTS	IV
RÉSUMÉ.....	VI
ABSTRACT	IX
TABLE DES MATIÈRES	XII
LISTE DES TABLEAUX.....	XVIII
LISTE DES FIGURES	XIX
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	XXVII
LISTE DES ANNEXES	XXXI
CHAPITRE 1 INTRODUCTION.....	1
1.1 Maladies cardiovasculaires & pontage.....	1
1.2 Prothèse idéale.....	3
1.2.1 Structure de l'artère.....	3
1.2.2 Analyse pathologique	4
1.2.3 Propriétés idéales d'une prothèse vasculaire.....	5
1.3 Prothèses existantes	6
1.3.1 Utilisation clinique	6
1.3.2 Les défis des petits diamètres.....	7
1.4 Développement de nouvelles prothèses	8
1.4.1 Changements de paradigme	9
1.4.2 Travaux majeurs en étude clinique.....	11
1.4.3 Statut actuel	12
1.5 Cadre du projet	13

CHAPITRE 2	FRONTIÈRE DES CONNAISSANCES	14
2.1	Conception de structures vasculaires	14
2.1.1	Propriétés mécaniques clés.....	14
2.1.2	Biomatériaux vasculaires	15
2.1.3	Fabrication de structures poreuses	17
2.1.4	Description des structures utilisées	18
2.2	Lutte contre la thrombogénicité	20
2.2.1	Des propriétés de surface au thrombus	20
2.2.2	Adsorption de protéines	22
2.2.3	Revêtements bioactifs	23
2.2.4	Revêtements anti-adhésifs (<i>low-fouling</i>).....	24
2.3	Endothélialisation.....	25
2.3.1	Endothélialisation <i>in vivo</i>	26
2.3.2	Ensemencement <i>in vitro</i>	27
2.3.3	Favoriser l'endothélialisation.....	30
2.4	Cellules musculaires lisses : amies ou ennemies ?.....	42
2.4.1	Empêcher l'hyperplasie néointimale.....	42
2.4.2	Interactions media-intima.....	43
2.4.3	Revêtement abluminal.....	43
2.5	Biofonctionnalisation	44
2.5.1	Fonctionnalisation : création de groupes d'ancrage.....	45
2.5.2	Immobilisation de protéines	47
2.6	Méthodes de caractérisation	56
2.6.1	Propriétés mécaniques.....	56

2.6.2	Fonctionnalisation et densités	57
2.6.3	Bioactivité (<i>in vitro</i>)	59
CHAPITRE 3	STRATÉGIE	64
3.1	Description	64
3.2	Hypothèses	65
3.3	Objectifs spécifiques	65
3.4	Composantes des revêtements développés.....	66
3.5	Considérations pratiques	66
3.5.1	Substrats utilisés	66
3.5.2	Caractérisation et contrôle.....	67
CHAPITRE 4	ARTICLE 1 – A NON-DAMAGING CHEMICAL AMINATION PROTOCOL FOR POLY(ETHYLENE TEREPHTHALATE) – APPLICATION TO THE DESIGN OF FUNCTIONALIZED COMPLIANT VASCULAR GRAFT	68
4.1	Résumé	68
4.2	Header	69
4.3	Abstract	69
4.4	Keywords	69
4.5	Introduction	70
4.6	Experimental	72
4.6.1	Chemicals and reagents.	72
4.6.2	Fabrication of PET structures.....	72
4.6.3	Chemical treatments on PET structures	73
4.6.4	SEM imaging.....	74
4.6.5	Characterization of mechanical properties	74
4.6.6	Characterization of amino group densities.....	75

4.6.7	Functionalization with L-cysteine	75
4.6.8	Statistical analysis	76
4.7	Results	76
4.7.1	Pristine PET mats	77
4.7.2	PVAm-aminolysis on PET tubular mats	78
4.7.3	Subsequent functionalization with L-cysteine	80
4.7.4	Hydrolysis on PET planar mats	81
4.7.5	EtDA-aminolysis on PET planar mats	82
4.7.6	PVAm-aminolysis on PET tubular scaffolds	83
4.8	Discussion	83
4.9	Conclusions	88
4.10	Acknowledgments	88
4.11	Notes	89
4.12	References	89
CHAPITRE 5	ARTICLE 2 – DEVELOPMENT OF A POLYESTER COATING COMBINING ANTI-THROMBOGENIC AND CELL ADHESIVE PROPERTIES – INFLUENCE OF SEQUENCE AND SURFACE DENSITY OF ADHESION PEPTIDES	95
5.1	Résumé	95
5.2	Header	96
5.3	Keywords.	96
5.4	Abstract	96
5.5	Introduction	97
5.6	Materials and methods	100
5.6.1	Chemical and reagents	100
5.6.2	Peptide grafting	101

5.6.3	Cell adhesion	103
5.6.4	Platelet attachment	105
5.6.5	XPS characterization of protein adsorption	106
5.6.6	Statistical analysis	106
5.7	Results	107
5.7.1	Peptide functionalization strategy	107
5.7.2	HUVEC adhesion onto peptide-functionalized PET films	112
5.7.3	Thrombogenicity of peptide-functionalized PET films	117
5.8	Discussion	120
5.9	Conclusion.....	125
5.10	Supporting information available.....	125
5.11	Corresponding Author.....	126
5.12	Acknowledgments.....	126
5.13	References	126
CHAPITRE 6 ARTICLE 3 – CO-IMMOBILIZATION OF ADHESIVE PEPTIDES AND VEGF WITHIN A DEXTRAN-BASED COATING FOR VASCULAR APPLICATIONS.....		135
6.1	Résumé	135
6.2	Header	136
6.3	Abstract	136
6.4	Keywords	137
6.5	Introduction	137
6.6	Materials and methods	140
6.6.1	Material and reagents	140
6.6.2	Dextran-VS production and characterization	141
6.6.3	96-well plates functionalization	142

6.6.4	Cell assays	144
6.6.5	Statistical analysis	145
6.7	Results	146
6.7.1	Production of dextran-VS.....	146
6.7.2	Properties of grafted dextran-VS.....	146
6.7.3	Peptide immobilization	151
6.7.4	Cell adhesion on peptide-functionalized wells.....	151
6.7.5	E5-VEGF and RGD co-immobilization.....	155
6.7.6	Cell proliferation	157
6.8	Discussion	161
6.8.1	Dextran coating	161
6.8.2	Adhesive peptides and cell selectivity	162
6.8.3	VEGF immobilization.....	163
6.8.4	Co-immobilization of peptides and VEGF.....	164
6.8.5	Endothelialization vs hyperplasia.....	165
6.9	Conclusion.....	166
6.10	Acknowledgments	166
6.11	References	166
CHAPITRE 7	DISCUSSION GÉNÉRALE	176
CHAPITRE 8	CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS	182
BIBLIOGRAPHIE	187
ANNEXES	212

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1-1 : Propriétés idéales d'une prothèse vasculaire.	6
Tableau 1-2 : Choix de la prothèse en fonction du type de vaisseau (Chlupáč et al., 2009)	7
Tableau 1-3 : Événements marquants du développement de prothèses vasculaires (tirés de (Chlupáč et al., 2009; Peck et al., 2012)).....	9
Tableau 1-4 : Stratégies pour le développement de prothèses artérielles performantes.	10
Tableau 2-1 : Description morphologique et mécanique des structures de PET (tiré de (Moreno et al., 2011))	19
Tableau 2-2 : Intégrines des cellules vasculaires et ligands.....	33
Tableau 2-3 : Peptides sélectifs aux EC vs plaquettes et SMC.....	34
Tableau 2-4 : Stratégies incluant l'immobilisation de VEGF pour favoriser l'endothélialisation (End.) de prothèses vasculaires ou la vascularisation (Vasc.) de structures pour le génie tissulaire.	38
Tableau 2-5 : Synergie entre facteurs d'adhésion et de prolifération immobilisés.....	41
Tableau 2-6 : Influence de la densité de peptides/protéines greffées.....	55
Tableau 4-1 : Description of pristine PET structures by mechanical testing of both planar mats and tubular scaffolds.	77
Tableau 5-1 : Description of cysteine-tagged peptides. Peptides were produced via solid phase synthesis and dissolved in slightly acidic aqueous medium. Free thiol concentration was measured thanks to Ellman's reagent as described in the material and methods section (n=4).	102
Tableau 5-2 : Grafted peptide densities.....	111

LISTE DES FIGURES

Figure 1-1 : Traitements de l'athérosclérose.....	2
Figure 1-2 : Structure d'un vaisseau sanguin.....	3
Figure 1-3 : Étapes menant à l'échec d'une greffe autologue lors d'un pontage coronarien (adaptée de (Baron et al., 2010)).....	4
Figure 1-4 : Compliance et perméabilité des prothèses synthétiques (Salacinski et al., 2001).....	8
Figure 2-1 : Structure de PET observée au microscope électronique à balayage (SEM).	18
Figure 2-2 : (A) Adhésion et activation plaquettaires et (B) principaux agents anti-thrombotiques utilisés pour la modification de prothèses vasculaires (adapté de (S. Li & Henry, 2011)). ...	21
Figure 2-3 : Régulation de l'adhésion et de l'activation plaquettaire par les cellules endothéliales (adapté de (S. Li & Henry, 2011)).	26
Figure 2-4 : Stratégies d'endothélialisation de prothèses vasculaires et défis associés.	27
Figure 2-5 : Environnement extracellulaire et multiples signaux biomoléculaires (Rice et al., 2013).	30
Figure 2-6 : (A) Points focaux d'adhésion (adapté de (Mittra et al., 2005)) et (B) intégrines (adapté de (Hynes, 2007)). Les intégrines absentes sur les cellules endothéliales sont grisées.	32
Figure 2-7 : Voies de signalisation induite par l'activation de VEGFR-2 par VEGF (adapté de (Cross, Dixelius, Matsumoto, & Claesson-Welsh, 2003)).	36
Figure 2-8 : Stratégie générale de greffage de biomolécules.	44
Figure 2-9 : Modifications chimiques du PET.	45
Figure 2-10 : Intérêts de l'immobilisation de facteurs de croissance (Ito, 2008).....	48
Figure 2-11 : Interaction super-hélice entre les peptides (EVSALEK) ₅ et (KVSALKE) ₅ , ou E5 et K5, respectivement.	51
Figure 2-12 : Mesures de compliance de prothèses vasculaires.....	57
Figure 2-13 : Système d'étude en condition de cisaillement (E. J. Anderson & Knothe Tate, 2007).	63

Figure 4-1 : SEM imaging of pristine PET planar mats.....	77
Figure 4-2 : Reactions schemes between PET and (A) PVAm, (B) NaOH and (C) EtDA.....	78
Figure 4-3 : Amino group densities resulting from PVAm treatment of PET planar mats (solid squares, ■) and tubular structures (empty squares, □), as a function of the pH of the reaction (n = 3).	79
Figure 4-4 : Mechanical characterization of the PVAm treatment of PET mats. (A) Mechanical properties of the treated mats, i.e. strength at yield (black symbols, n = 5) and strain at maximum load (gray symbols, n = 5), are represented as a function of the pH of the solution (prior to dioxane addition) for PVAm treatment (squares) and for NaOH treatment (circles), for comparison. For the strength at yield of PVAm-treated mats (black squares), Bonferroni-ANOVA was performed (* means $p < 0.05$). Complementary SEM imaging was carried out on (B) PVAm-covered and (C) hydrolyzed mats, both treated at pH 12.25.	80
Figure 4-5 : Amino group densities resulting from EtDA treatment of PET mats, as a function of the EtDA concentration in methanol (n = 3).	81
Figure 4-6 : Comparison of PVAm-based and EtDA-based aminolysis. (A) Mechanical properties of the treated mats, i.e. strength at yield (black symbols, n = 5) and strain at maximum load (gray symbols, n = 5), are represented as a function of the corresponding amino group density (n = 3), for both PVAm (squares) and EtDA treatment (triangles). Complementary SEM imaging was carried out on (B) PVAm-covered mats treated at pH 11.25 and (C) 30% EtDA-treated mats, both leading to low amino group density (7.2 ± 0.6 and 4.5 ± 0.6 $\mu\text{mol/g}$, respectively).	82
Figure 4-7 : Mechanical properties of PVAm-treated tubular scaffolds. Compliance under physiological conditions (black columns) and burst pressure (gray columns) were measured as described in the Materials and Methods section (n = 3) on PET scaffolds treated with PVAm at different pH conditions. Bonferroni-ANOVA was performed for both compliance and burst pressure (* means $p < 0.05$ and ** means $p < 0.005$).	84
Figure 5-1 : Reaction scheme between aminated PET films, NHS-PEG12-PDP and cysteine-tagged peptides.....	108

Figure 5-2 : Influence of salt concentration on PEG grafting onto PVAm-coated PET films. Salt concentration was increased by supplementing the PBS with NaCl up to 5 M. The grafted PEG density (A) was evaluated through cysteine grafting and subsequent absorbance measurement to quantify the amount of released 2-pyridinethiol. Low-fouling PEG coverage (B) was assessed through HUVEC adhesion and subsequent resazurin assay. Data are represented as means and standard deviations of the means derived from three independent assays, each performed in triplicates. ($n=3 \times N=3$) 109

Figure 5-3 : Grafting kinetics of cysteine-tagged peptides on PEG-functionalized PET films. The grafting reaction was monitored by absorbance thanks to the stoichiometric release of 2-pyridinethiol, as described in the M&M. The equation (1) was used to fit the data. For each peptide, 20 μ M were reacted with PEG-functionalized substrates. For each peptide, one representative curve out of four ($n = 4$) is shown on the main figure, along with its corresponding fit. The inset illustrates the kinetic constant k for each peptide, derived from fitting to the equation (1)..... 110

Figure 5-4 : XPS characterization of peptide-functionalized PET films. Two surveys were performed on each surface, with one surface per condition. The table data correspond to average values. RGD, YIGSR and REDV refer to corresponding peptide-grafted films at the maximal density (100%). On the figure, data plots are shifted by 10 eV and 5000 counts/s to make observations and comparisons easier..... 112

Figure 5-5 : HUVEC adhesion on peptide-functionalized PET films as determined by resazurin assay. Data are represented as means and standard deviations of the means derived from three independent assays, each performed in triplicates. ($n=3 \times N=3$) Groups of data are denoted with a * when significantly different from mock peptide-grafted films ($\#, p < 0.05$). The mix group corresponds to a grafting of 90% YIGSR and 10% RGD. A significant difference between the mix and 10% RGD as well as 100% YIGSR was observed ($\$, p < 0.05$). 113

Figure 5-6 : HUVEC attachment (A) and spreading (B) on peptide-functionalized PET films as determined by fluorescent imaging. Data are represented as means and standard deviations of the means derived from six different samples, taken from two independent experiments ($n=3 \times N=2$). The cell density and averaged cell area were measured on five images per sample using the CellProfiler software thanks to nuclei and actin staining (Figure annexe - 3). Groups

of data are denoted with a * when significantly different from mock peptide-grafted films (#, $p < 0.05$). 115

Figure 5-7 : Representative images of HUVEC on peptide-functionalized PET films. Focal adhesions are revealed by vinculin immunostaining (red) while cytoskeleton is visualized by F-actin staining (green). Nuclei (blue) were stained with DAPI. Focal adhesion could be observed for all RGD densities as well as for 100% YIGSR and PVAm-coated films. Scale bars represent 20 μm 117

Figure 5-8 : Platelet attachment onto peptide-functionalized PET films as determined by fluorescent imaging. Data are represented as means and standard deviations of the means derived from two different samples, taken from five independent experiments ($n=2 \times N=5$). The blood donor was different in each of those five experiments. The platelet density (A) and covered area (B) were measured on three images per sample using the CellProfiler software thanks to CD61 staining (Figure annexe - 5). Among peptide-grafted films, groups of data are denoted with a * when significantly different from mock peptide-grafted films (#, $p < 0.05$). 118

Figure 5-9. Evaluation of protein adsorption on peptide-functionalized PET films as determined by XPS. Two surveys were performed on each surface, with one surface per condition. RGD, YIGSR and REDV refer to corresponding peptide-grafted films at the maximal density (100%). N 1s (N) and S 2p (S) atomic percentages as well as their ratio (N/S) are represented. 120

Figure 6-1. Production of dextran-vinylsulfone (dextran-VS). VS was added on dextran through the reaction of DVS in presence of 25 to 100 mM NaOH. VS-modified dextrans (A) with an initial molecular weight of 20 kDa (B), 40 kDa (C) and 70 kDa (D) were characterized through $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy. The degree of VS modification was determined by integrating peaks a, b1 and b2 and comparing them to the number of saccharide units ($C = c1 + c2$, see insets on (B), (C) and (D)). As a summary, all calculated degrees of VS modifications are represented on (E) as a function of the NaOH concentration in the reaction mixture. 147

Figure 6-2. Biofunctionalization of carboxylated CellBIND[®] microplates. (1) Grafting of PAAm to carboxylated wells through carbodiimide chemistry; (2) Grafting of dextran-VS to aminated wells in alkaline conditions; (3) Grafting of peptides (e.g. K5 and RGD, successively) to VS-

functionalized wells through Michael addition; (4) Tethering of E5-VEGF to K5-functionalized wells through K5/E5 capture.....	148
Figure 6-3. Properties of dextran-VS once grafted on microplates.....	150
Figure 6-4. HUVEC and AoSMC adhesion on peptide-functionalized wells. Different cell-adhesive peptides, namely (A) RGD; (B) YIGSR ; (C) REDV ; as well as (D) RGE were grafted onto wells covered with dextran-VS 70k-75. As specified in the x axis (table), a range of concentration going from 1.56 to 100 μM of peptide was used for the grafting step. A control was added with 100 μM of peptides incubated on top of pre-blocked dextran, to check for non-specific adsorption (rightmost columns on the figures). HUVEC and AoSMC adhesion were evaluated through a resazurin assay, which data were normalized to the adhesion level on PAAm-coated wells (without dextran). ($n=5$).....	152
Figure 6-5. HUVEC and AoSMC adhesion on peptide-functionalized wells. The images correspond to the results presented on Figure 6-4 for peptides grafted at a concentration of 12.5 μM , leading to <i>ca.</i> 1 nmol/cm^2 . Actin and nuclei staining are shown in green and blue, respectively. Scale bar represents 200 μm	154
Figure 6-6. Characterization of E5-VEGF capture on functionalized wells. All wells were functionalized with PAAm and subsequently with dextran-VS 70k-75. Wells were then reacted with either the K5, RGD, or both successively. Various concentrations of E5-VEGF, from 0.5 pM to 50 nM, were then incubated on the functionalized wells. The “(K5+RGD)” condition corresponds to pre-blocked dextran-VS, representing the non-specific adsorption of K5 and RGD. E5-VEGF capture was evaluated through two methods:	156
Figure 6-7. (A) HUVEC and (B) AoSMC proliferation on wells functionalized with both RGD and E5-VEGF, as determined by a resazurin assay. RGD (or RGE) was grafted at 10 μM , leading to <i>ca.</i> 1 nmol/cm^2 and E5-VEGF was captured at concentrations ranging from 50 pM to 50 nM, as mentioned on the table axis. Growth medium was GF-free for most conditions, and supplemented with soluble E5-VEGF at 2 nM for comparison with grafted E5-VEGF. On both figures, the rightmost two columns corresponded to complete medium. All datasets were compared with the control without E5-VEGF (denoted #) at D4, thanks to a one-way ANOVA and are denoted * for $p<0.05$ and ** for $p<0.005$. ($N=3 \times n=5$).....	158

Figure 6-8. HUVEC proliferation on functionalized wells. The images correspond to the results presented on Figure 6-7A for HUVEC grown in GF-free medium on wells that were functionalized with RGD alone (first line) or with both RGD and E5-VEGF at 5 nM (second line). Controls are shown for HUVEC grown in medium supplemented with soluble E5-VEGF (2 nM, third line) or in complete medium (fourth line) on RGD-functionalized wells. Actin and nuclei staining are shown in green and blue, respectively. Scale bar represents 200 μ m.

.....159

Figure annexe - 1 : Influence des paramètres de réaction sur le greffage de polyvinylamine (PVAm) et polyallylamine (PAAm) sur des films de PET. (A) Influence du pH : La température était de 70°C et le temps de réaction de 24h ; (B) Influence du temps et de la température à pH 12.25 pour le PVAm et 12.5 pour le PAAm. Pour les deux figures, le protocole correspond à celui décrit dans le Chapitre 4, avec 100 mM de NH_2 et 27% de dioxane dans le mélange final. La densité d'amines était mesurée par Orange II (Noel et al., 2011)......212

Figure annexe - 2 : HUVEC proliferation on peptide-functionalized PET films as determined by resazurin assay. The latter was performed one hour after HUVEC seeding (D0) and repeated on the same samples after two (D2) and five (D5) days in full medium. The experiment was done once on triplicates. ($n=3 \times N=1$).213

Figure annexe - 3 : Examples of images used to generate data from Figure 6. Nuclei and cells, as identified by the CellProfiler software, are outlined in blue and red, respectively. Scale bars represent 50 μ m.214

Figure annexe - 4 : Comparison of resazurin assay with cell density and spreading area.215

Figure annexe - 5 : Examples of images used to generate data from Figure 8. Platelets, as identified by the Cell Profiler software, are outlined in blue. Scale bars represent 50 μ m.216

Figure annexe - 6 : Calibrations issues de la réaction des nitrites avec le réactif de Griess.218

Figure annexe - 7 : Quantification of available amino groups on functionalized wells, as determined by an Orange II assay. ($N = 3 \times n = 4$).219

Figure annexe - 8 : Quantification of grafted peptide densities as determined by an indirect Ellman's assay. ($n=5$).219

Figure annexe - 9 : HUVEC and AoSMC adhesion on YIGSR-functionalized wells. YIGSR and its control SGIYR were grafted onto wells covered with dextran-VS 70k-75. As specified in the x axis (table), a range of concentration going from 1.56 to 100 μM of peptide was used for the grafting step. A control was added with 100 μM of peptides incubated on top of pre-blocked dextran, to check for non-specific adsorption (rightmost columns on the figures). HUVEC and AoSMC adhesion were evaluated through a resazurin assay, which data were normalized to the adhesion level on PAAm-coated wells (without dextran). ($n=5$).....220

Figure annexe - 10 : HUVEC and AoSMC adhesion on YIGSR-functionalized wells. The images correspond to the results presented on Figure annexe - 9 for peptides grafted at a concentration of 12.5 μM , leading to ca. 1 nmol/cm². Actin and nuclei staining are shown in green and blue, respectively. Scale bar represents 200 μm220

Figure annexe - 11 : HUVEC and AoSMC adhesion on CAG-functionalized wells. CAG was grafted onto wells covered with dextran-VS 70k-75. As specified in the x axis (table), a range of concentration going from 1.56 to 100 μM of peptide was used for the grafting step. A control was added with 100 μM of peptides incubated on top of pre-blocked dextran, to check for non-specific adsorption (rightmost columns on the figures). HUVEC and AoSMC adhesion were evaluated through a resazurin assay, which data were normalized to the adhesion level on PAAm-coated wells (without dextran). ($n=5$).....221

Figure annexe - 12 : Stratégies de greffage de peptides K5 étiquetés avec une cystéine (–SH) basées sur (A) la fonction oPSS ; (B) la fonction maléimide ou (C) la fonction vinylsulfone.222

Figure annexe - 13 : Greffage de cystéine à 250 μM (excès) sur des films de PET fonctionnalisés avec du PVAm et un lien LC-SPDP (*cf.* protocoles du Chapitre 4). Le modèle utilisé est $d[\text{Tpyr}]/dt = k[\text{Cys}][\text{oPSS}]$. Le milieu de greffage était un mélange de PBS et d'éthanol (EtOH) au % v/v indiqué. La réaction dans 90% d'éthanol n'a pas été menée à terme du fait d'une précipitation de la Tpyr.223

Figure annexe - 14 : Greffage du peptide K5 sur un film de PET fonctionnalisé avec du PVAm et du LC-SPDP (*cf.* protocoles du Chapitre 4). Après 3h de réaction, un greffage successif de cystéine à la même concentration a été mis en œuvre.....224

Figure annexe - 15 : Quantité de thiols libres sur K5 en fonction du temps. La mesure est faite par un test Ellman au temps et pH indiqués.225

Figure annexe - 16 : Modification du K5 avec un groupement oPSS.....	226
Figure annexe - 17 : Stratégie SPDP-DVS : conversion de la fonction oPSS en fonction VS.	227
Figure annexe - 18 : Greffage de protéines étiquetées E5 sur structures de PET (fibres) fonctionnalisées avec K5 via la stratégie SPDP-DVS (<i>cf.</i> Figure annexe - 17). La quantité de protéines dans le surnageant a été déterminée par ELISA (indirect). (A) Greffage de E5-EGF. La condition « Cys » correspond à la 3 ^{ème} condition de la figure B, c'est-à-dire sans K5, tandis que la condition K5 correspond à la 5 ^{ème} condition de la figure B. (B) Greffage de E5-VEGF à 100 pM. Plusieurs contrôles supplémentaires sont ajoutés par rapport à la figure A. L'ajout de cystéine (Cys) vise à bloquer les sites VS actifs.	228
Figure annexe - 19 : Réaction parasite entre le dex-VS et TCEP.	229
Figure annexe - 20 : Greffage de peptides sur structures de PET fonctionnalisées avec PEG-SPDP.	230
Figure annexe - 21 : Adhésion des HUVEC sur des structures de PET fonctionnalisées avec des peptides d'adhésion. L'adhésion sur des puits de culture en polystyrène traité (CellBIND) ou non (PS) est montrée à titre informatif.....	231
Figure annexe - 22 : Greffage de Dex-VS 70k-75 sur (A) films et (B) fibres de PET préalablement fonctionnalisées avec du PAAM. La quantité d'amines a été déterminée par un test Orange II.	232
Figure annexe - 23 : Quantification de la quantité de RGD dans le surnageant de réaction par un test Ellman.....	232
Figure annexe - 24 : Capture de E5-VEGF sur films et fibres fonctionnalisées avec K5, RGD ou les deux, caractérisée par (A) ELISA direct et (B) ELISA indirect. Les surfaces étaient des disques de 1 cm de diamètre, placées dans des plaques 48 puits en PS durant l'expérience, et recouvertes avec 500 µL de solution de E5-VEGF à 5 nM ou 50 pM dans du FBS 10%. Le protocole complet est similaire à celui décrit pour les plaques à 96 puits fonctionnalisées au Chapitre 6. La condition (K5+RGD) correspond au cas où les fonctions VS du dextrane étaient pré-bloquées et représente donc l'adsorption non-spécifique des peptides.	233

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
APTES	(3-Aminopropyl)triethoxysilane
BAEC	Cellules endothéliales aortiques bovines (<i>Bovine Aortic Endothelial Cells</i>)
BrDU	<i>5-bromo-2'-deoxyuridine</i>
CAG	Séquence d'acide aminés cysteine-alanine-glycine
CAM	<i>Chick chorioallantoic membrane assay</i>
CFDA-AM	<i>5-carboxyfluorescein diacetate acetoxymethyl ester</i>
CIPAAm	<i>2-carboxyisopropylacrylamide</i>
COL	Collagène
DAPI	4',6'-diamidino-2-phénylindole
EC	Cellules endothéliales (<i>Endothelial cells</i>)
ECM	Matrice extracellulaire (<i>Extracellular matrix</i>)
EGF	Facteur de croissance épidermique (<i>Epidermal Growth Factor</i>)
EGFR	Récepteur de EGF (<i>Epidermal growth factor receptor</i>)
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EPC	Cellules endothéliales progénitrices (<i>Endothelial progenitor cells</i>)
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinases</i>
FA	Points focaux d'adhésion (<i>Focal adhesion</i>)
FAK	<i>Focal adhesion kinase</i>
FDA	<i>US Food and drug administration</i>
FG	Fibrinogène
(b)FGF	Facteur de croissance (basique) des fibroblastes (<i>(basic) fibroblast growth factor</i>)
FN	Fibronectine

FTIR	<i>Fourier transform infrared spectroscopy</i>
GAG	Glycosaminoglycanes
HA	Acide hyaluronique (<i>hyaluronic acid</i>)
HFF	<i>Human foreskin fibroblasts</i>
HRP-Strep	<i>Horseradish peroxidase-Streptavidine</i>
HSPG	<i>Heparan sulfate proteoglycans</i>
HSVEC	<i>Human saphenous vein endothelial cells</i>
HUVEC	<i>Human umbilical vascular endothelial cells</i>
LbL	Couche par couche (<i>Layer-by-Layer</i>)
LC-SPDP	<i>Long chain - Succinimidyl 6-(3-[2-pyridyldithio]-propionamido) hexanoate</i>
LN	Laminine
MAPK	<i>Mitogen activated protein kinase</i>
MTS	<i>3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium</i>
MTT	<i>3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide</i>
NHS/EDC	<i>N-Hydroxysuccinimide/ 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide</i>
NP VEGF/Hep/PLL	Nanoparticule contenant VEGF enrobé d'héparine puis de poly-L-lysine
NO	Oxyde nitrique (<i>Nitric oxide</i>)
eNOS	<i>Endothelial nitric oxide synthase</i>
OSP	Ostéopontine
PAAm	Polyallylamine
PAA-g-PE	<i>Polyacrylicacid-grafted polyethylene</i>
PCL	Polycaprolactone
PDGF(-BB)	Facteur de croissance d'origine plaquettaire, composé de deux chaînes A, B ou une combinaison des deux (BB) (<i>platelet-derived growth factor</i>)

PEG	Polyéthylène glycol
PEI	Polyéthylèneimine
PELCL	Poly(ethylene glycol)-b-poly(L -lactide-co-caprolactone)
PET	Polyéthylène téréphtalate (<i>polyethylene terephthalate</i>)
PEVA	Poly(ethylene-co-vinyl alcohol)
PGA	Acide poly-glycolique
PGI ₂	Prostacycline
PI	Iodure de propidium
PI3K/Akt	Phosphoinositide 3-kinase / protéine kinase B
PLCL	Poly(L -lactide-co-ε-caprolactone)
PLLA	Acide poly-L-lactique
PMMA	Polyméthacrylate de méthyle
PS	Polystyrène
<i>o</i> PSS	<i>ortho</i> -pyridyl disulfide
(e)PTFE	Polytétrafluoroéthylène expansé (<i>expanded polytetrafluoroethylene</i>)
PU	Polyuréthane
PVAm	Polyvinylamine
QCM-D	Microbalance à quartz (<i>Quartz Crystal Microbalance with Dissipation Monitoring</i>)
REDV	Séquence d'acides aminés Arginine-Glutamate-Aspartate-Valine
RGD	Séquence d'acides aminés Arginine-Glycine-Aspartate
RGE	Séquence d'acides aminés Arginine-Glycine-Glutamate
SEM	Microscope électronique à balayage (<i>Scanning Electron Microscope</i>)
SIMS	Spectrométrie de masse à ionisation secondaire (<i>Secondary Ion Mass Spectrometry</i>)
SMC	Cellules musculaire lisses (<i>Smooth muscle cells</i>)

SPR	Résonance plasmonique de surface (<i>surface plasmon resonance</i>)
Src	<i>Sarcoma, Proto-oncogene tyrosine-protein kinase</i>
TBO	Bleu de toluidine O
TCEP	Tris(2-carboxyéthyl)phosphine
TGF- β	Facteur de croissance de transformation β (<i>transforming growth factor β</i>)
TSP	Thrombospondine
VEGF	Facteur de croissance endothelial vasculaire (<i>Vascular endothelial growth factor</i>)
VEGF-Fc	Protéine recombinante correspondant à VEGF étiquetée avec un domaine Fc
VEGFR-1	1 ^{er} récepteur du facteur de croissance endothélial vasculaire (<i>Vascular endothelial growth factor receptor 1</i>), aussi Flt-1 (<i>Fms-related tyrosine kinase 1</i>)
VEGFR-2	2 ^{ème} récepteur du facteur de croissance endothélial vasculaire (<i>Vascular endothelial growth factor receptor 2</i>), aussi appelé KDR (<i>Kinase insert Domain Receptor</i>) ou Flk-1 (<i>Fetal Liver Kinase 1</i>)
VN	Vitronectine
vWF	Facteur de von Willebrand
WB	Immunobuvardage de type Western
WST	<i>Water soluble Tetrazolium salt</i>
XPS	<i>X-ray Photoelectron Spectroscopy</i>
XTT	<i>2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide</i>
YIGSR	Séquence d'acides aminés Tyrosine-Isoleucine-Glycine-Sérine-Arginine

LISTE DES ANNEXES

Annexe A	Comparaison polyvinylamine et polyallylamine.....	212
Annexe B	Informations supplémentaires au chapitre 5.....	213
Annexe C	Informations supplémentaires au chapitre 6.....	217
Annexe D	Greffage des peptides étiquetés avec cystéine et défis associés pour K5	222
Annexe E	Tranfert aux structures non tissées	230

CHAPITRE 1 INTRODUCTION

1.1 Maladies cardiovasculaires & pontage

Malgré de grandes avancées réalisées dans le domaine de la cardiologie, les maladies cardiovasculaires représentent toujours une des causes majeures de handicap et de décès dans le monde. En 2010 aux États-Unis, environ un tiers des décès du pays (786 500) étaient dus aux maladies cardiovasculaires (Mozaffarian et al., 2015). Ce haut taux de mortalité est dû majoritairement à l'athérosclérose, qui correspond à un dépôt graduel de lipides à la paroi des artères formant des plaques d'athérome. La croissance de ces dernières cause une réduction de la section efficace (ou lumière) de l'artère, i.e. une *sténose*, et peut mener ultimement à une ischémie (diminution de l'apport sanguin à un organe). Cette dernière est causée par l'occlusion d'une artère, soit par coagulation (formation d'un thrombus au niveau des plaques, Figure 1-1b) ou par embolie (relargage de la plaque dans la circulation) (van Lith & Ameer, 2011).

Les zones sténosées peuvent alors nécessiter un remplacement ou une consolidation de l'artère pour prévenir ou traiter les accidents vasculaires. L'idée de remplacer l'artère endommagée par un conduit veineux a été une des plus grandes avancées de la chirurgie cardiaque au début du 20^{ème} siècle (Baron, Dashwood, Arbeus, Filbey, & Souza, 2010). Cette technique chirurgicale, désormais nommée *pontage*, est pratiquée couramment depuis les années 1960. Le pontage est encore effectué aujourd'hui lorsque les chirurgies minimalement invasives, telles que l'angioplastie et/ou la pose d'une endoprothèse vasculaire (*stent*), ne sont plus adaptées (Figure 1-1c et d). Concrètement, le pontage consiste en une déviation du flux sanguin, en amont de la région problématique, vers un autre conduit (Figure 1-1a).

Historiquement, le premier conduit à avoir été utilisé est la veine saphène interne de la jambe, compte tenu du fait que (1) celle-ci n'est pas indispensable (d'autres vaisseaux assurent la circulation dans les tissus périphériques), (2) sa longueur est suffisamment importante et (3) sa position superficielle la rend facile d'accès (Baron et al., 2010). Cependant, un conduit veineux reste imparfait pour le remplacement d'artères telle que l'artère coronaire et il est aujourd'hui plus courant de pratiquer un pontage hybride à l'aide de l'artère thoracique interne ou de l'artère radiale de l'avant-bras, en complément de la veine saphène (Baron et al., 2010). Notons que le choix du conduit greffé dépend fortement de la condition (passée et présente) du patient ainsi que du chirurgien et de l'institution.

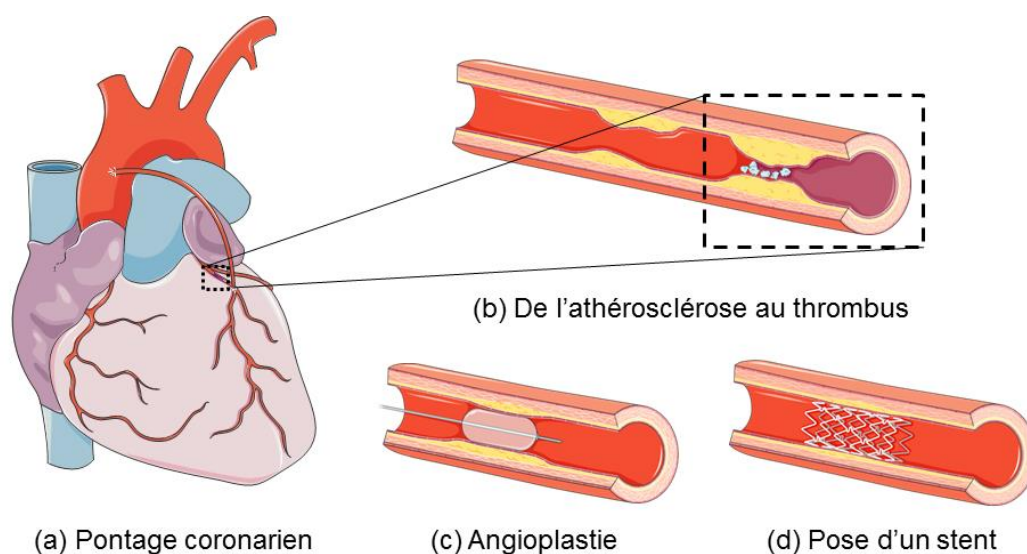


Figure 1-1 : Traitements de l'athérosclérose.

Cependant, de nombreux patients (jusqu'à 30% d'entre eux) ne disposent pas de vaisseaux adéquats disponibles pour une greffe autologue (de Mel, Jell, Stevens, & Seifalian, 2008; van Lith & Ameer, 2011). De plus, la chirurgie d'extraction du conduit de remplacement ainsi que le pontage présentent tous deux de nombreux défis. Qu'elles soient liées à l'endommagement du conduit lors de l'intervention ou simplement intrinsèques, les différences entre le vaisseau originel et le conduit de remplacement constituent des risques d'échecs importants (Baron et al., 2010). De fait, une hospitalisation prolongée ainsi qu'une réintervention (dans plus de 50% des cas) sont à prévoir suite à un pontage coronarien. En 2010, 397 000 chirurgies de pontage coronarien ont été effectuées sur seulement 219 000 patients aux États-Unis, et des coûts moyens de 149 500 \$ étaient associés à chaque intervention chirurgicale (Mozaffarian et al., 2015). Ces données révèlent la nécessité d'améliorer la qualité et l'efficacité du traitement pour limiter les récidives à la fois coûteuses, risquées et pénibles. Par conséquent, de nombreuses études, dont celle-ci, se concentrent sur l'élaboration de substituts vasculaires artificiels. Ces prothèses affranchiraient le patient d'une intervention supplémentaire liée à l'autogreffe d'une part et, si leur performance est avérée, pourraient limiter les risques de récidives.

1.2 Prothèse idéale

1.2.1 Structure de l'artère

La conception d'une prothèse suppose l'analyse de la structure d'une artère. Nous en donnerons une description succincte, inspirée de celles données par plusieurs revues dont (Sorrentino & Haller, 2011).

Une artère est composée de trois couches majeures, illustrées sur la Figure 1-2.

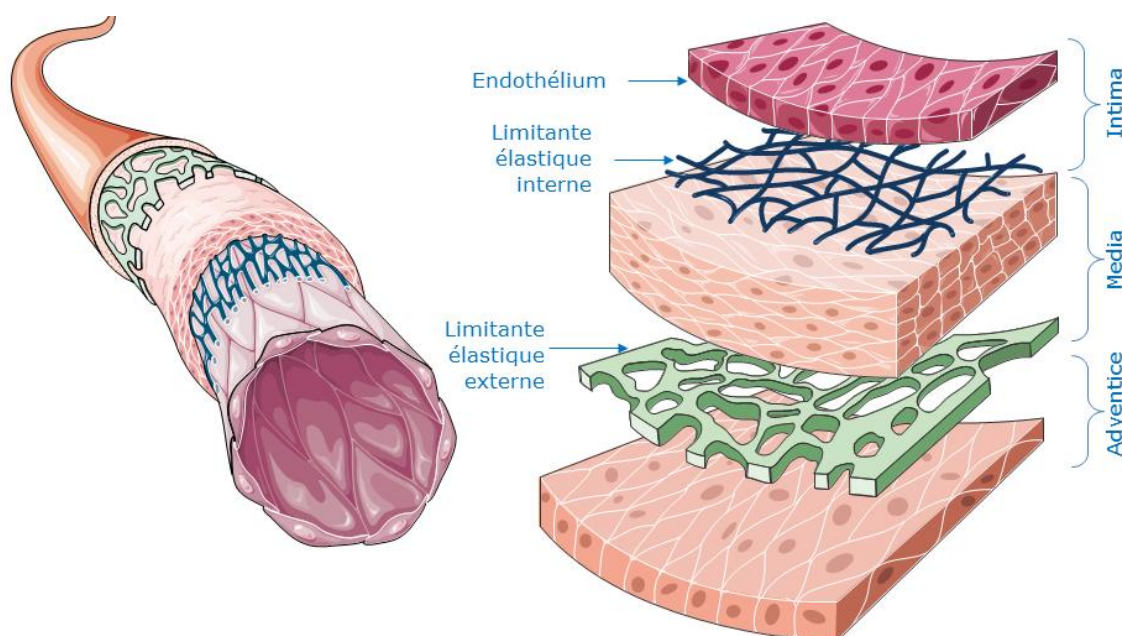


Figure 1-2 : Structure d'un vaisseau sanguin.

L'*endothélium*, ou intima, est constitué d'une monocouche de cellules endothéliales vasculaires (EC), reposant sur une base de collagène de type IV et de laminine (à l'interface intima/media). Cette couche forme une barrière continue, semi-perméable et hémocompatible entre le sang et la paroi artérielle. Elle contrôle le flux sanguin, l'activation, l'adhésion et l'agrégation plaquettaire, l'adhésion de leucocytes ainsi que la migration et la prolifération des cellules musculaires lisses (SMC) de la media. L'endothélium maintient ainsi l'intégrité du vaisseau en prévenant la formation de thrombus et la réaction d'hyperplasie néointimale (*cf.* partie 1.2.2). Il s'agit donc d'une surface de choix, que l'on va chercher à imiter ou à reformer à la surface luminale de la prothèse. Notons que cette fine couche de la paroi artérielle n'a quasiment aucun rôle structurel/mécanique et est similaire quelle que soit l'artère considérée.

La media est composée de cellules musculaires lisses (SMC) et d'un enchevêtrement de collagène et d'élastine. Ce dernier lui confère un comportement mécanique bien particulier de par l'arrangement spatial des fibres de collagène et d'élastine. Cette couche représentant 70% de l'épaisseur du mur artériel est la composante structurelle majeure de l'artère et son comportement mécanique devra être reproduit par la prothèse synthétique.

Enfin, *l'adventice* assure une certaine communication entre l'artère et les organes et tissus environnants. Elle est également composée d'élastine et de collagène mais son rôle mécanique est bien moindre que pour la media. On y trouve des fibroblastes, des nerfs, des vaisseaux (*vasa vasorum*), etc.

1.2.2 Analyse pathologique

Pour comprendre quelles caractéristiques de l'artère sont essentielles pour une prothèse, il apparaît pertinent d'analyser les pathologies observées lors d'un pontage veineux et ainsi mieux comprendre comment les éviter (Figure 1-3).

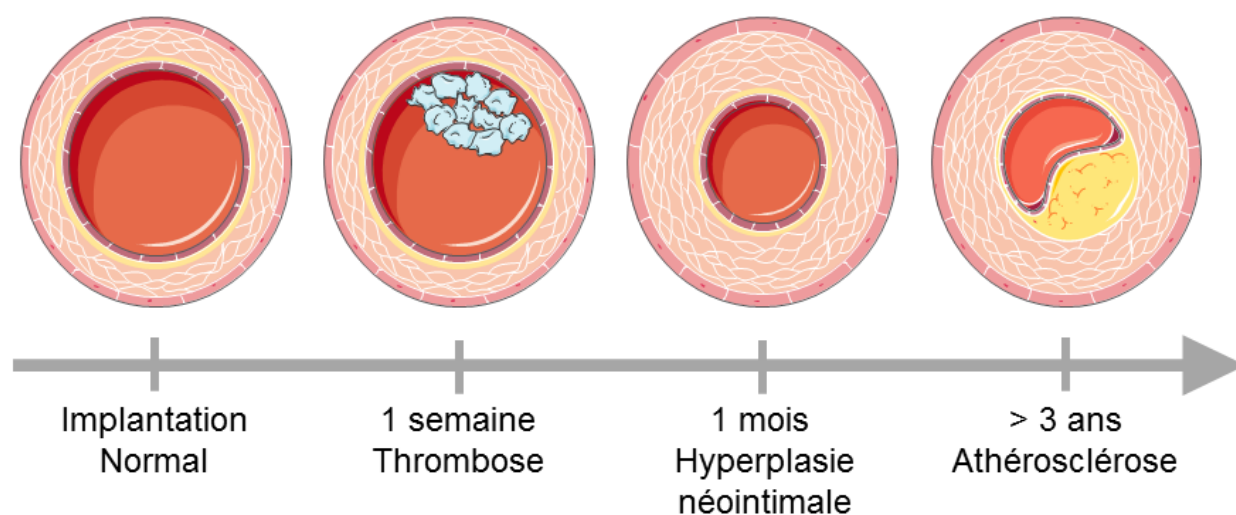


Figure 1-3 : Étapes menant à l'échec d'une greffe autologue lors d'un pontage coronarien (adaptée de (Baron et al., 2010))

Trois phénomènes principaux contribuent à l'échec des greffes autologues :

- *Thrombose (dans le premier mois)* : Il s'agit de la formation d'un thrombus (caillot sanguin) pouvant mener à l'occlusion du vaisseau. Elle est généralement initiée par l'endommagement de l'endothélium, laissant apparente la couche limitante élastique interne (Figure 1-2). Celle-

ci est composée essentiellement de collagène, qui va favoriser l'adhésion plaquettaire. Cette dernière va à la fois activer la cascade de coagulation, le système immunitaire (via les leucocytes) et le système du complément, pour mener ultimement à la formation d'un thrombus (de Mel et al., 2008; van Lith & Ameer, 2011). La thrombose concerne 3 à 12% des greffes pour un pontage coronarien (Baron et al., 2010). A plus long terme, la sécrétion de facteurs de croissance (PDGF et bFGF) par les plaquettes va favoriser la prolifération des SMC ainsi que le dépôt de protéines de l'ECM, entraînant une hyperplasie néointimale (van Lith & Ameer, 2011).

- ***Hyperplasie néointimale (dans la première année)*** : Il s'agit de la prolifération excessive des SMC de la media, et de leur migration subséquente vers l'intima. Cette hyperplasie résulte des contraintes imposés à l'endothélium pendant la chirurgie et/ou après implantation (perturbations hémodynamiques aux anastomoses¹). Elle concerne 10 à 30% des greffes pour un pontage coronarien. Dans le cas des veines, ce n'est généralement pas la cause directe de l'échec mais elle est à l'origine de la formation d'athérome et de l'athérosclérose (Baron et al., 2010).
- ***Athérosclérose (après plusieurs années)*** : La maladie est étroitement liée aux perturbations hémodynamiques, avec une localisation des plaques d'athérome à des endroits spécifiques de l'arbre artériel tels que les bifurcations (Chatzizisis et al., 2007). Ainsi, les nouvelles perturbations liées à la greffe vont contribuer à l'évolution de la maladie. De plus, cette dernière est également accélérée par l'endommagement de l'endothélium, l'hyperplasie ainsi que par la présence de macrophages spumeux et autres cellules du système immunitaire (Baron et al., 2010).

1.2.3 Propriétés idéales d'une prothèse vasculaire

Sur la base des connaissances de la structure de l'artère (*cf.* partie 1.2.1) et des analyses présentées en 1.2.2, de nombreuses revues dressent une liste des propriétés idéales d'un substitut de vaisseau sanguin (Tableau 1-1) (Campbell & Campbell, 2007; Chan-Park et al., 2009; Sorrentino & Haller, 2011).

¹ Connexions entre la vasculature et le greffon, aux extrémités de ce dernier.

Tableau 1-1 : Propriétés idéales d'une prothèse vasculaire.

Mécaniques	Biologiques	Autres
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Compliance² adéquate ▪ Pression d'éclatement suffisante ▪ Résistance à la rupture et au pliage (<i>kink resistant</i>) 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Biocompatibilité (non inflammatoire, non toxique, non immunogène) ▪ Hémocompatibilité (non thrombogène) ▪ Bioactivité (Ré-endothélialisation facilitée) 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Disponibilité dans de nombreuses dimensions (longueur, diamètre) ▪ Production économique ▪ Prêt à l'emploi

À l'heure actuelle, aucune prothèse vasculaire synthétique n'a pu satisfaire au cahier des charges au complet. Des résultats satisfaisants ont néanmoins été obtenus et plusieurs substituts sont déjà sur le marché et utilisés de manière routinière.

1.3 Prothèses existantes

En pratique, pour qualifier l'efficacité d'une prothèse synthétique, on utilise un paramètre global: la perméabilité (*patency*). On considère généralement une prothèse perméable (*patent*) si elle a conservé au moins 70% de son diamètre originel. On reporte alors la proportion de sujets (humains ou animaux) dont la prothèse est restée perméable à un temps donné.

1.3.1 Utilisation clinique

Les prothèses synthétiques faites de polymères tels que le polytétrafluoroéthylène (PTFE, Teflon®) ou le polyéthylène téréphtalate (PET, Dacron®) sont actuellement des références pour le remplacement d'artères de large diamètre (> 6 mm). En effet, malgré des propriétés mécaniques et biologiques imparfaites, ces conduits ont une perméabilité de l'ordre de 90% à 5 ans pour des pontages aorto-iliaques (Chlupáč, Filova, & Bačáková, 2009) contre 80% pour les autogreffes (Chan-Park et al., 2009). Ces prothèses offrent ainsi une alternative intéressante aux autogreffes, qui restent cependant préférées lors du remplacement d'artères de faible diamètre (< 6 mm). Le choix du conduit de remplacement se fait donc en fonction du type de vaisseau comme résumé dans le Tableau 1-2.

²Aptitude d'une cavité organique à changer de volume sous l'influence d'une variation de pression. (Grand Dictionnaire Terminologique, cf. partie 2.1.1)

Tableau 1-2 : Choix de la prothèse en fonction du type de vaisseau (Chlupáč et al., 2009)

Type de vaisseaux	Artères de large diamètre (>8 mm)	Artères de diamètre moyen (6-8 mm)	Artères de petit diamètre (< 6 mm)	Veines
Exemple	Aorte, iliaque	Carotide	Coronaire	Cave
1 ^{er} choix	Prothèse	Prothèse ou autogreffe	Grefe artérielle ou veineuse	Grefe veineuse
2 ^{ème} choix	Allogreffe, greffe veineuse	Prothèse ou autogreffe	Prothèse, allogreffe	Prothèse, allogreffe

1.3.2 Les défis des petits diamètres

L'efficacité des prothèses synthétiques classiques varie avec le diamètre du conduit à remplacer, d'où les choix présentés dans le Tableau 1-2. De nombreux défis se posent alors pour le remplacement de petits vaisseaux (< 6 mm) tels que l'artère coronaire, impliquée dans plus de la moitié des maladies cardiovasculaires.

Similairement aux greffes autologues (*cf.* partie 1.2.2), les observations cliniques démontrent une *forte thrombogénicité* des prothèses et une réaction immunitaire complexe impliquant les cellules musculaires lisses et les cellules endothéliales vasculaires, menant à une *hyperplasie néointimale* au niveau des anastomoses (Chan-Park et al., 2009; Chlupáč et al., 2009; van Lith & Ameer, 2011). Ces problèmes, présents également pour les prothèses de large diamètre, se retrouvent amplifiés du fait du faible flux sanguin et de la faible section efficace des vaisseaux, augmentant les risques d'occlusion. La perméabilité à 5 ans des prothèses synthétiques classiques chute ainsi de 90 %, pour l'artère iliaque (ø 15 mm) à 10-40% pour l'artère fémorale (ø 6 mm) (Chan-Park et al., 2009; Chlupáč et al., 2009). Plus de la moitié des prothèses synthétiques nécessitent ainsi une nouvelle intervention dès les cinq premières années après leur implantation (Salacinski et al., 2001). Aujourd'hui les greffes autologues restent encore le standard quand le diamètre devient trop faible du fait de ces échecs (Chlupáč et al., 2009; Vara et al., 2005).

Les principales limites à l'origine des résultats cliniques insatisfaisants avec les prothèses de petit diamètre sont :

- *des propriétés de surface inadéquates* qui ne favorisent pas la colonisation des cellules endothéliales à partir des anastomoses. Sans ré-endothélialisation, la surface du matériau synthétique, généralement hydrophobe, est exposée et les protéines du sérum ainsi que les plaquettes vont y adhérer. Ceci va mener à une thrombose et également contribuer à l'hyperplasie néointimale (*cf.* partie 1.2.2).
- *une compliance mécanique limitée* par rapport à celle des artères originelles (Figure 1-4). La différence de compliance entre l'artère d'origine et la prothèse entraîne des perturbations hémodynamiques, spécialement au niveau des anastomoses. Le cisaillement et les turbulences induites contribuent également au développement de l'hyperplasie néointimale (Konig et al., 2009; Moreno et al., 2011; Salacinski et al., 2001; Tai, Salacinski, Edwards, Hamilton, & Seifalian, 2000; van Lith & Ameer, 2011);

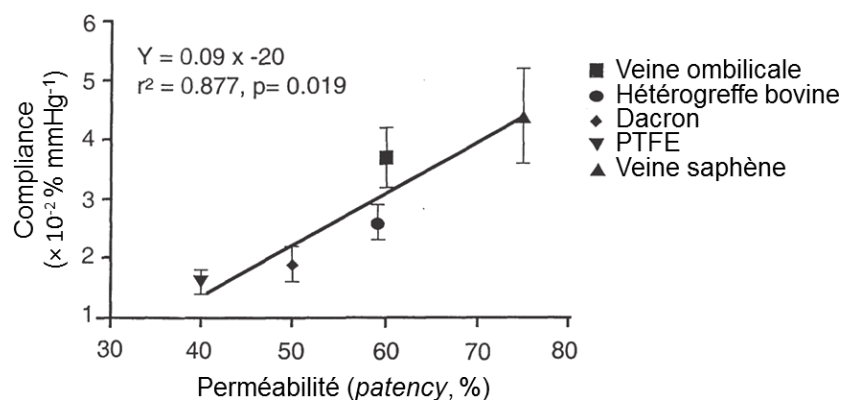


Figure 1-4 : Compliance et perméabilité des prothèses synthétiques (Salacinski et al., 2001).

1.4 Développement de nouvelles prothèses

Les points du cahier des charges initial (Tableau 1-1) associés à la compliance et aux propriétés biologiques ne sont donc pas vérifiés par les prothèses standard (PET et PTFE). Le choix du biomatériau et de sa structure est alors à redéfinir dans l'élaboration de prothèses de petit diamètre. Cette quête de la prothèse idéale, efficace à faible diamètre, constitue encore aujourd'hui le Saint Graal (*Holy grail*) du domaine vasculaire (Campbell & Campbell, 2007; Chlupáč et al., 2009; Walpoth & Bowlin, 2005).

1.4.1 Changements de paradigme

Différentes stratégies ont été développées au cours des 50 dernières années pour répondre à cette problématique, en s'éloignant plus ou moins des prothèses standard de large diamètre (Baguneid et al., 2006; Campbell & Campbell, 2007; Chlupáč et al., 2009; Pankajakshan & Agrawal, 2010; Peck, Gebhart, Dusserre, McAllister, & L'Heureux, 2012; Schmedlen, Elbjeirami, Gobin, & West, 2006; Vara et al., 2005). Pour comprendre d'où viennent les solutions proposées, il faut remettre en perspective les différentes avancées du siècle dernier (Tableau 1-3).

Tableau 1-3 : Événements marquants du développement de prothèses vasculaires (tirés de (Chlupáč et al., 2009; Peck et al., 2012))

Année	Leader	Découverte
1906	Carrel Goyannes	1 ^{er} pontage veineux (animal) ————— (humain)
1952	Voorhees	1 ^{ère} prothèse en polymère
1957	Ku	Prothèse en Dacron (PET)
1966	Rosenberg	1 ^{ère} structure décellularisé
1975	Norton & Eiseman	Prothèse en Teflon (PTFE)
1978	Herring	Idée d'ensemencer avec EC
1986	Weinberg & Bell	Gels de collagène + cellules vasculaires (EC, SMC et fibroblastes) + structure de Dacron
1987	Zilla	Ensemencement avec EC humaines sur structure PTFE
1998	L'Heureux	Construction sans structure matérielle à partir de cellules vasculaires humaines (feuilletés cellulaires)
1999	Niklason	Ensemencement avec EC bovines sur structure biorésorbable (PGA)
2001	Kaushal	Ensemencement avec EPC bovines sur vaisseau décellularisé
2001	Shin'oka	Ensemencement de cellules souches sur structure biorésorbable

L'idée née en 1978 d'*ensemencer les prothèses synthétiques avec des cellules endothéliales* avant implantation est au cœur d'une majorité de stratégies encore en développement aujourd'hui. De

grandes avancées ont été faites depuis, avec la découverte de nouvelles sources de cellules souches et progénitrices (*cf.* partie 2.3.2.1) qui ont commencé à être exploitées au début du siècle. À cette idée s’est ajoutée celle de l’utilisation de *biomatériaux naturels* pour former une prothèse reproduisant la paroi artérielle. Le collagène, l’élastine la fibrine de l’ECM sont ainsi au cœur de ces constructions dont le défi est d’obtenir des propriétés mécaniques suffisantes (Seifu, Purnama, Mequanint, & Mantovani, 2013). Plusieurs solutions ont été proposées dont la combinaison à une matrice polymérique synthétique, permanente (*e.g.* Dacron) ou dégradable, ou encore la formation d’un tissu musculaire au sein de la matrice via l’ensemencement de SMC (Sorrentino & Haller, 2011). Le problème de la thrombogénicité intrinsèque du collagène persiste néanmoins (van Lith & Ameer, 2011). Suite aux travaux pionniers de Bell et L’Heureux, d’autres stratégies biomimétiques visant à se débarrasser de la structure synthétique ont été développées, soit en la choisissant *biorésorbable*, soit en utilisant une structure naturelle comme les *tissus décellularisés*, soit en abandonnant complètement l’idée de structure matérielle préalable et en utilisant des *feuilletés cellulaires* (Tableau 1-4).

Tableau 1-4 : Stratégies pour le développement de prothèses artérielles performantes.

Paradigme	Prothèse vasculaire (TEVG)		Néo-vaisseaux sanguins (TEBV)		
Structure	Structure synthétique		Structure naturelle		Sans structure
	Permanente	Biorésorbable	À base de protéines	Tissu décellularisé	Feuillets cellulaires
Exemple	PET, PTFE, PU	PGA, PCL	Collagène, fibrine, élastine	Artère bovine ou porcine	EC, SMC, fibroblastes
Avantage	Reproductibilité Mécanique		Naturel Non immunogène	Structure ECM	Non immunogène Résistants
Désavantage	Pas remodelable Polymère présent à long terme	Propriétés variables durant la dégradation	Faibles propriétés mécaniques Thrombogénicité	Immunogé- nité	Non reproductibilité Préparation complexe
Temps de préparation	Variable (cf. partie 2.3.2.2)		Jusqu'à 12 semaines	3 semaines	Jusqu'à 12 semaines
Revues	(Ercolani, Del Gaudio, & Bianco, 2013; Kannan, Salacinski, Butler, Hamilton, & Seifalian, 2005)		(Stegemann, Kaszuba, & Rowe, 2007)		
	(Chlupáč et al., 2009) ; (Peck et al., 2012) ; (Seifu et al., 2013); (van Lith & Ameer, 2011)				

1.4.2 Travaux majeurs en étude clinique

Différentes revues présentent un tableau listant les prothèses en développement rendues en étude clinique ou proches de l'être (Bajpai & Andreadis, 2012; Kannan et al., 2005; Kapadia, Popowich, & Kibbe, 2008; Peck et al., 2012). Nous citerons ici les principaux exemples.

Les travaux de Zilla et al. sur l'ensemencement de prothèse de PTFE avec des cellules endothéliales ont montré des résultats cliniques prometteurs. Des prothèses de faible diamètre ont été implantées sur plus de 300 patients, suivis pendant plus de 15 ans. Les résultats montrent une perméabilité de l'ordre de 78% (resp. 62%) à 5 ans et de 71% (resp. 55%) à 10 ans pour les prothèses de 7 mm (resp. 6 mm). De plus, la quasi-totalité des prothèses (97.5%) présentaient effectivement un endothélium autologue grâce à l'ensemencement de cellules (Deutsch et al., 2009).

Les travaux de Shin'oka et al. sur les prothèses biorésorbables ensemencées avec des cellules souches sont également en étude clinique, bien que se limitant pour le moment à des larges diamètres (12 à 24 mm). Au total, 25 patients ont été suivis pendant 6 ans, avec aucune complication majeure reportée pour le moment (un cas de thrombose et 4 resténoses, toutes traitées avec succès). Notons que cette étude reste limitée (patients jeunes, peu nombreux et provenant d'une seule institution) (Hibino et al., 2010).

Les travaux de l'Heureux et al. ont mené à l'élaboration de la prothèse LifeLine, composée uniquement de cellules du patient et requérant 10 semaines de culture en bioréacteur. Des prothèses de 4 à 8 mm de diamètre ont ainsi été testées cliniquement pour l'hémodialyse. Cette première étude permettait de limiter les risques pour les patients et de faciliter l'observation du comportement des prothèses. Il est difficile de tirer des conclusions pour le moment car l'étude ne comprenait que 10 patients mais les premiers résultats sont assez encourageants (perméabilité de 76% à 3 mois) (McAllister et al., 2009).

1.4.3 Statut actuel

De manière générale, l'utilisation du génie tissulaire est au cœur des stratégies développées pour concevoir des structures hybrides endothélialisées et donc hémocompatibles. Le défi est alors de déterminer une combinaison matrice/cellules structurellement appropriée pour satisfaire à la fois aux exigences mécaniques et biologiques du substitut vasculaire.

“The enormous variety of biomaterials that have been reported for vascular repair in combination with the virtually stagnant translation to clinical practice raises the question whether further development of novel materials for vascular repair is still warranted. Reevaluation of the rationale for vascular repair strategies may be necessary to make valid judgments on what type of research to embark upon. One not only needs to consider theoretical feasibility, but also practical and cost-based issues, as well as how current healthcare regulations may or may not support novel technologies” (van Lith & Ameer, 2011)

Aussi innovantes et prometteuses soient elles, les stratégies s'approchant du vaisseau purement biologique (TEBV) présentent en effet plusieurs défis, notamment quant au contrôle des propriétés mécaniques et biologiques qui évoluent au cours de la formation du néotissu (van Lith & Ameer, 2011). La manipulation chirurgicale de ces vaisseaux est également problématique et l'on retrouve des problèmes similaires aux autogreffes (Baron et al., 2010), en particulier aux niveaux des anastomoses où les perturbations hémodynamiques contribuent à la thrombose et l'hyperplasie (van Lith & Ameer, 2011). À cela s'ajoutent des questions de mise en place clinique, de par le matériel, le temps et l'expertise nécessaires à leur fabrication ainsi que les questions sous-jacentes de reproductibilité (Seifu et al., 2013; Sorrentino & Haller, 2011; van Lith & Ameer, 2011; Vara et al., 2005).

Dans l'étude clinique menée par l'équipe de Zilla, un tiers des patients n'étaient pas en mesure d'attendre la procédure de préparation des prothèses, qui n'était pourtant que de 28 jours (Deutsch et al., 2009). On est pourtant bien loin des 12 semaines nécessaires dans la plupart des approches « biologiques » (TEBV) revues récemment par Seifu *et al.* (Seifu et al., 2013). Ainsi, même si elles ne restaurent pas la fonctionnalité biologique du tissu, les stratégies « synthétiques » continuent d'exister car elles sont plus réalistes d'un point de vue clinique.

“Therefore, the hope remains that the use of synthetic grafts will be a bridging technology until TEBVs become a reality.” (van Lith & Ameer, 2011)

1.5 Cadre du projet

Dans le contexte du remplacement d'artères de petit diamètre, l'objectif général du projet vise à développer un revêtement multifonctionnel de *prothèse synthétique* possédant les caractéristiques suivantes :

- Applicable à une structure polymérique aux propriétés mécaniques définies (*e.g.* compliance) *sans l'endommager* ;
- Résistant à l'adsorption de protéines et l'adhésion plaquettaire, i.e. *non thrombogène* ;
- Favorable à l'adhésion et la prolifération de cellules endothéliales, i.e. *endothélialisable* ;
- Défavorable à la prolifération des cellules musculaires lisses, i.e. *ne contribuant pas à l'hyperplasie néointimale*.

Notons que la portée des stratégies et concepts de fonctionnalisation qui seront développés ne devra pas être restreinte à notre cas d'étude et devra être adaptable à différents polymères (permanents ou résorbables) et à différents domaines du biomédical. Bien que l'application visée ici en premier lieu soit celle des prothèses vasculaires, des défis similaires sont rencontrés pour la régénération tissulaire au sein de matrices polymères. Des propriétés multifonctionnelles sont en effet attendues pour ces matrices devant assurer la croissance d'un ou plusieurs types cellulaires ainsi que la vascularisation des néotissus (Rice et al., 2013).

CHAPITRE 2 FRONTIÈRE DES CONNAISSANCES

2.1 Conception de structures vasculaires

2.1.1 Propriétés mécaniques clés

Comme discuté à la partie 1.3.2, les propriétés mécaniques des prothèses sont cruciales et déterminantes pour leur succès (perméabilité) *in vivo*.

Une de ces propriétés clés est la **compliance**, qui doit correspondre à celle des artères pour éviter l'hyperplasie aux sites d'anastomoses. La compliance se définit comme la capacité de la structure à se dilater suite aux changements de pression artérielle lors des battements cardiaques (entre la systole et la diastole). Les travaux reconnus des groupes de Seifalian (Salacinski et al., 2001; Tai et al., 2000) et de L'Heureux (Konig et al., 2009; L'Heureux et al., 2006) ont permis d'acquérir des données sur la biomécanique artérielle, fixant les objectifs à atteindre pour les prothèses, *i.e.* une compliance de l'ordre de $8 \times 10^{-2} \% \text{ mmHg}^{-1}$. Les méthodes de caractérisation de la compliance seront décrites en partie 2.6.1.

Une autre propriété importante pour les substituts vasculaires est la **pression d'éclatement**. (Moreno et al., 2011; Pankajakshan & Agrawal, 2010) Comme son nom l'indique, il s'agit d'évaluer la résistance de la prothèse sous haute pression. L'exigence n'est pas aussi élevée que pour la compliance étant donné que ce comportement limite d'éclatement est bien loin d'une pression viable pour le système cardiaque. Ainsi, on exige une pression d'éclatement non pas égale à celle de l'artère (*ca.* 3500 mmHg (Konig et al., 2009; L'Heureux et al., 2006)) mais supérieure à celle de la veine saphène utilisée pour les autogreffes, *i.e.* de l'ordre de 1700 mmHg. (Chan-Park et al., 2009; Pankajakshan & Agrawal, 2010)

Le comportement mécanique de l'artère est déterminé par l'organisation de l'ECM, notamment dans la media (*cf.* partie 1.2.1). Le collagène rigide associé aux fibres d'élastine donne à l'artère son comportement composite viscoélastique. Ce dernier est relativement difficile à reproduire puisque rendre un biomatériau plus compliant va généralement dans le sens d'une pression d'éclatement plus faible, et réciproquement (Chan-Park et al., 2009).

2.1.2 Biomatériaux vasculaires

2.1.2.1 Généralités

Lors de la conception de prothèses synthétiques, il apparaît primordial de sélectionner judicieusement un matériau parmi ceux à disposition. Au-delà des attentes mécaniques, un des principaux critères de choix est celui de la *biocompatibilité*. Cette notion, particulièrement difficile à définir, s'avère en pratique associée à une série de réactions non souhaitées suite à l'implantation du dispositif. On parle ainsi plutôt de biocompatibilité négative, et on recherche des matériaux non toxiques, non cancérigènes, *etc.* Tous les métaux sujets à l'oxydation, inévitable en milieu biologique, sont par exemple écartés, justifiant l'utilisation de titane ou d'acier inoxydable comme composant majoritaire des endoprothèses métalliques. Les polymères, matériaux organiques, sont généralement une classe de choix en termes de biocompatibilité, puisqu'ils induisent une réaction inflammatoire moindre. Rappelons que la biocompatibilité n'impose pas l'utilisation de matériaux bioinertes mais parfois, au contraire, suppose leur *bioactivité* (*e.g.* endothélialisation des prothèses, biorésorbabilité, *etc.*). À ces contraintes de biocompatibilité s'ajoutent ensuite celles liées au comportement biomécanique et à des considérations pratiques (disponibilité, coût, *etc.*) décrites en introduction (Tableau 1-1).

2.1.2.2 Polymères synthétiques utilisés

Le polyéthylène téréphtalate (PET) est un polymère aromatique présentant des propriétés mécaniques et une biocompatibilité remarquables qui en font un biomatériau de choix pour les applications biomédicales, en particulier dans le domaine vasculaire (Bide, Phaneuf, Brown, McGonigle, & LoGerfo, 2006; Marchand-Brynaert, Deldime, Dupont, Dewez, & Schneider, 1995; Muthuvijayan, Gu, & Lewis, 2009; Ng, Zhang, Liu, & Yang, 2009). Plus de 13 millions de dispositifs médicaux à base de PET sont implantés chaque année aux États-Unis, allant des pansements et cathéters à des dispositifs bien plus complexes telles que les prothèses ventriculaires et aortiques, voire des cœurs artificiels (Bide et al., 2006). Dans le contexte de la fabrication de structures pour prothèse artérielle, le PET présente également l'avantage de pouvoir être modelé facilement au moyen de divers procédés tels que le soufflage ou l'électrofilage (*cf.* partie 2.1.3). Des structures fibreuses peuvent ainsi être formées de façon à faciliter le recouvrement par les cellules du milieu une fois le dispositif implanté. Ainsi, les prothèses à base de fibres tissées

(*woven*) ou tricottées (*knitted*) de PET (Dacron) ont déjà fait leurs preuves en tant que prothèses artérielles de large diamètre.

Le polytétrafluoroéthylène (ePTFE ou PTFE), est un fluoropolymère inerte chargé négativement et possède des propriétés anti-adhésives le rendant attractif pour des applications vasculaires (faible thrombogénicité). Le PTFE est mis en forme par chauffage, étirement et extrusion pour donner un matériau microporeux, assemblé par la suite sous la forme de structures nœuds-fibrilles (Chlupáč et al., 2009; Zilla, Bezuidenhout, & Human, 2007). Des prothèses vasculaires en PTFE existent pour l'hémodialyse, la réparation d'anévrisme (endoprothèse) et pour les pontages cardiaques (Mehta, Mukherjee, Patterson, & Fishbein, 2011). Comme pour les prothèses en Dacron, les prothèses de PTFE sont des structures fibreuses de porosité variable, couramment utilisés pour le remplacement d'artères de large diamètre (Zilla et al., 2007). Le manque de bioactivité des prothèses en PTFE est cependant problématique pour sa ré-endothélialisation (Zilla et al., 2007), et différents revêtements sont en cours de développement pour y remédier (Crombez et al., 2005; Larsen, Kligman, Tang, Kottke-Marchant, & Marchant, 2007).

Les polyuréthanes (PU) forment une famille de polymères aux propriétés mécaniques modulables (par combinaison de segments durs et mous) présentant un intérêt pour les applications vasculaires. Les résultats cliniques des prothèses en PU ont eu des résultats variables du fait de leur dégradation *in vivo* (Chlupáč et al., 2009; Vara et al., 2005). Seifalian et collègues développent des prothèses à partir d'un composite de polycarbonate et polyuréthane (ChronoFlex®) ayant montré des propriétés remarquables de compliance et de résistance à la dégradation (prothèses VascuLink, MyoLink, CardioPass de la compagnie Advansource Biomaterials anciennement CardioTech International Inc.) (Kapadia et al., 2008; Salacinski et al., 2002). Des essais *in vivo* ont débuté pour vérifier leur perméabilité sur plusieurs années ainsi que leur résistance à la dégradation (Desai, Seifalian, & Hamilton, 2011). Une prothèse vasculaire en composite de PU, la prothèse Vectra® de la compagnie Bard Inc., a été approuvée par la FDA et est actuellement utilisée pour l'hémodialyse (Kapadia et al., 2008).

Les polymères biorésorbables sont des polymères synthétiques dégradables par réaction chimique (*e.g.* hydrolyse), par opposition aux polymères biodégradables où la dégradation se fait par un processus biologique (*e.g.* enzymatique). Leur vitesse de dégradation va dépendre du polymère en tant que tel mais aussi de la structure (*e.g.* ratio surface/volume) (Kannan et al., 2005). Les prothèses biorésorbables visent à obtenir un rôle structurel temporaire pendant la formation d'un

néotissu *in situ*. Les exemples les plus courants de polymères utilisés sont l'acide poly-L-lactique (PLLA), l'acide poly-glycolique (PGA) et le polycaprolactone (PCL). Ces polyesters se dégradent *in vivo* dans des délais allant de quelques jours à plusieurs mois pour le PCL, étant en ce sens plus prometteur que les autres (Nottelet et al., 2009). La disparition du matériau étranger à long terme donne un avantage certain à ces structures, mais pose encore de nombreux défis quant au contrôle des propriétés mécaniques de la prothèse au cours de sa dégradation/régénération tissulaire *in situ* (Ercolani et al., 2013).

2.1.3 Fabrication de structures poreuses

La structure choisie contribue à l'obtention de propriétés mécaniques intéressantes mais va aussi influencer sur l'interaction avec le milieu biologique. Les premières tentatives de remplacement d'artères avec des tubes synthétiques solides ont rapidement imposé l'emploi de structures poreuses (Zilla et al., 2007). Celles-ci miment de plus près l'ECM et favorisent la régénération et l'intégration tissulaire de la prothèse pour des pores de taille judicieusement choisie. Les pores plus grandes, comme ceux du Dacron tricoté, permettent une meilleure intégration cellulaire que les pores trop petites (*e.g.* Dacron tissé) mais ceci dépend de l'étanchéité (imposant alors un prétraitement des prothèses à l'albumine ou la gélatine) (Chlupáč et al., 2009; Zilla et al., 2007). La gamme de diamètre de pores idéales se situe vers 10-50 μm : en dessous de 10 μm , les cellules et petits capillaires ne peuvent s'insérer, et au-delà de 50 μm l'étanchéité n'est pas suffisante (Kannan et al., 2005; Zilla et al., 2007).

Deux principales options sont disponibles pour former de tels matériaux : l'introduction de pores dans un matériau par séparation de phase (*e.g.* prothèses en CPU (Salacinski et al., 2002)) ou l'assemblage de fibres en structures tissées ou non (*e.g.* PET, PTFE) (Zhang, Lim, Ramakrishna, & Huang, 2005). Cette dernière est généralement préférée, pour des raisons pratiques et également parce que plus proches de la structure de l'ECM, assemblage de fibres de protéines et polysaccharides (Ercolani et al., 2013; Hasan et al., 2014). Une méthode de fabrication suscitant un intérêt croissant est l'électrofilage (*electrospinning*), capable de former des fibres de diamètre variable (10 nm – 1 μm), enchevêtrées en structures à porosité variable (Ercolani et al., 2013; Hasan et al., 2014). Bien que moins répandu, le soufflage (*melt-blowing*) permet également d'obtenir des structures à diamètre de fibres (1-10 μm) et porosité contrôlés (Ellison, Phatak, Giles, Macosko, & Bates, 2007; Moreno et al., 2011; Zhang et al., 2005).

2.1.4 Description des structures utilisées

Le biomatériau retenu dans cette étude pour la fabrication de prothèses artérielles performantes pour le remplacement d'artères de faible diamètre est le PET. La philosophie est de conserver un polymère permanent pour toutes les raisons qui ont conduit à son utilisation pour les prothèses en Dacron et du fait des problèmes associés aux stratégies avec structure temporaire ou sans structure (*cf.* partie 1.4.3). L'hypothèse posée ici est que les limites des prothèses de Dacron, mécaniques et biologiques, peuvent être contournées en modifiant leur structure et propriétés de surface. Dans une optique de polyvalence, nous nous attacherons à ce que les concepts et stratégies développées soient transférables à d'autres polyesters synthétiques (*e.g.* PLLA).

Des structures fibreuses de PET ont été construites et étudiées par une équipe du CNRC avec laquelle notre équipe est en collaboration (Moreno et al., 2011). Les fibres de PET, de quelques micromètres de diamètre, ont été obtenues par soufflage et assemblées selon différents patrons, de façon à imiter la structure de la media et reproduire son comportement mécanique (Jouan, Bureau, Ajji, Huneault, & Mantovani, 2005). La structure retenue constitue un empilement de 20 couches de fibres, d'orientations successives décalées de 90° (Figure 2-1). L'orientation des fibres sur les faces externes a été choisie pour favoriser la croissance longitudinale des EC du côté luminal (*cf.* partie 2.3.3) ainsi que la croissance circonférentielle des SMC du côté abluminal des prothèses (*cf.* partie 2.4.2) (Chan-Park et al., 2009).

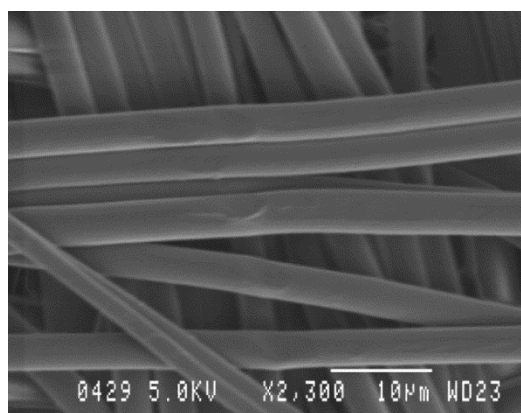


Figure 2-1 : Structure de PET observée au microscope électronique à balayage (SEM).

Ces structures ont été observées au microscope électronique à balayage (Figure 2-1) de façon à mettre en évidence certaines propriétés morphologiques (taille des fibres, distribution des pores, *etc.*) décrites dans la première partie du Tableau 2-1.

Tableau 2-1 : Description morphologique et mécanique des structures de PET (tiré de (Moreno et al., 2011))

	Paramètres	Valeurs
Morphologie	Gamme de diamètre des fibres (μm)	80% entre 2 et 6 20% entre 6 et 11
	Diamètre moyen des fibres (μm)	5.1 ± 2.6
	Gamme de diamètre de pores (μm)	1–20
	Diamètre de pore moyen (μm)	10.9 ± 5.6
	Aire moyenne des pores (μm^2)	117 ± 136
	Porosité (%)	70
Mécanique	Compliance (% mmHg^{-1})	$8.4 \pm 1.0 \times 10^{-2}$ (Artères humaines: 8.0×10^{-2})
	Pression d'éclatement (mmHg)	1509 ± 175 (Artères humaines: 2301–4225)

Le procédé de soufflage permet d'obtenir des structures planes ou tubulaires. Des tubes de 6 mm de diamètre ont ainsi été testés mécaniquement à pression physiologique (de 80 à 120 mmHg) pour juger du potentiel de ces structures à remplacer des artères de faible diamètre (Moreno et al., 2011). La proximité des propriétés mécaniques des structures avec celles des artères (Tableau 2-1), ainsi que les premiers résultats *in vitro* de croissance cellulaire à leur surface, rendent l'utilisation de ces structures de PET prometteuse pour l'application visée. Néanmoins, cette structure en tant que telle ne présente pas les propriétés essentielles de l'intima (*e.g.* anti-thrombogénicité), et une biofonctionnalisation va être nécessaire pour limiter la thrombogénicité et favoriser la ré-endothélialisation.

2.2 Lutte contre la thrombogénicité

La thrombose est initiée naturellement *in vivo* dans le cas de lésions de vaisseaux pour éviter les hémorragies. Elle est déclenchée par l'exposition du collagène sous-endothélial, auquel vont adhérer les plaquettes via des récepteurs glycoprotéiques (Li & Henry, 2011). Une cascade complexe d'événements est alors déclenchée. Sans entrer dans les détails des protéines et voies impliquées, celle-ci va mener à l'activation des plaquettes et à la formation d'un caillot à base de fibrine (thrombus), visant à bloquer le flux sanguin au travers de la lésion. Si un tel phénomène se produit au sein d'une prothèse artérielle, le thrombus va mener à l'occlusion de la prothèse.

2.2.1 Des propriétés de surface au thrombus

À l'implantation d'une prothèse, le matériau étranger se retrouve entouré de molécules d'eau et dans les quelques minutes qui suit recouvert de protéines du plasma s'adsorbant à sa surface. Les cellules (érythrocytes, leucocytes) et plaquettes circulant dans le sang ne voient plus alors le polymère originel mais la couche (dynamique) de protéines qui y sont adsorbées. Les protéines les plus abondantes du plasma sont l'albumine, les immunoglobulines G et le fibrinogène (Xu, Bauer, & Siedlecki, 2014). L'albumine n'est pas impliquée dans la thrombose tandis que le fibrinogène est au cœur du processus de coagulation (Figure 2-2-A). Ainsi, l'adhésion de plaquettes fait notamment suite à l'adsorption de fibrinogène (s'il y a lieu) et active la cascade de coagulation (voie extrinsèque) (Xu et al., 2014). Notons que la voie intrinsèque de la coagulation peut aussi être activée suite au contact du facteur XII avec la surface de la prothèse (Xu et al., 2014). Une fois la cascade de coagulation activée, un dépôt de fibrine, contenant des plaquettes activées et des cellules sanguines (caillot), se développe ainsi durant les premiers jours après l'implantation (Chlupáč et al., 2009).

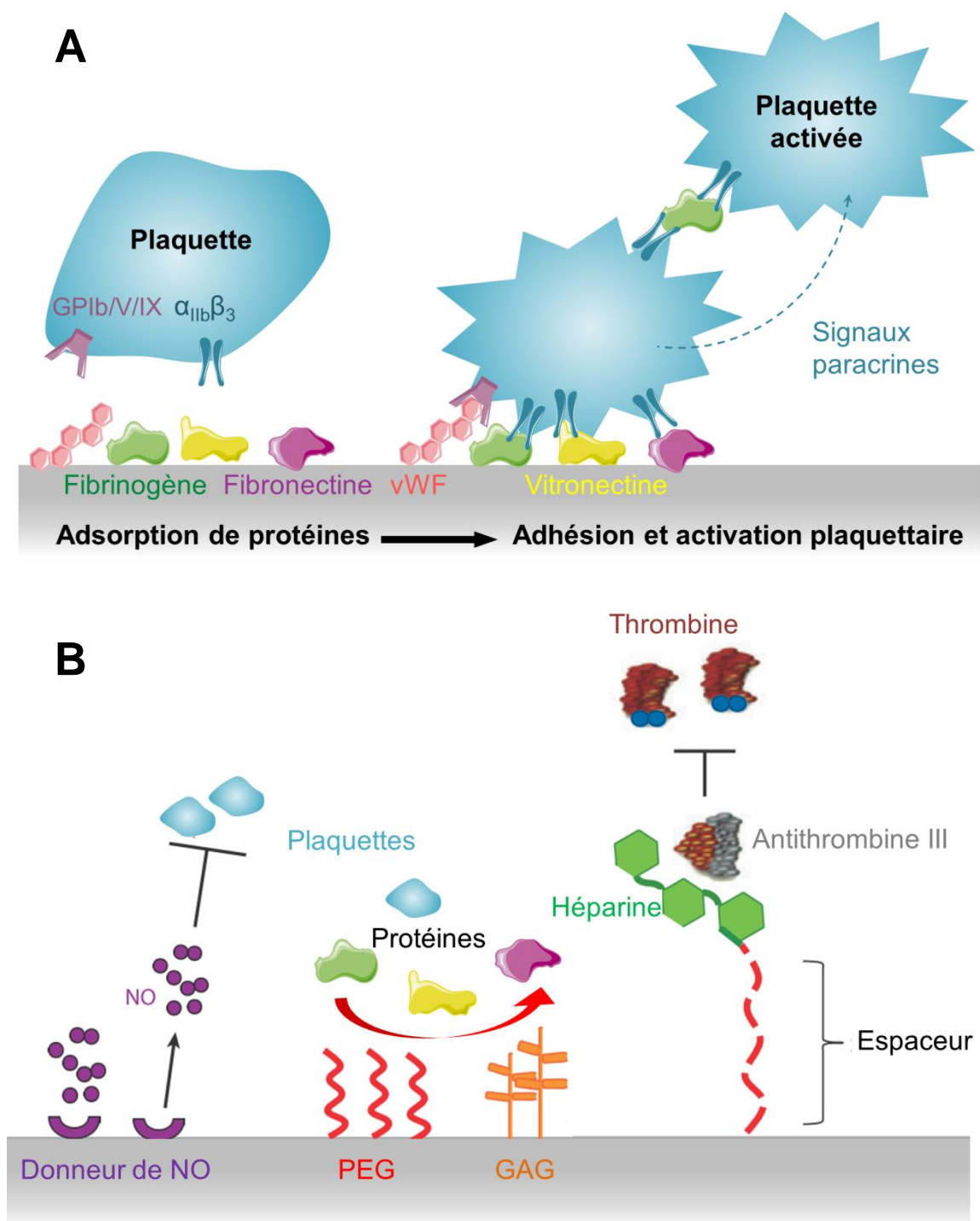


Figure 2-2 : (A) Adhésion et activation plaquettares et (B) principaux agents anti-thrombotiques utilisés pour la modification de prothèses vasculaires (adapté de (Li & Henry, 2011)).

2.2.2 Adsorption de protéines

L'adsorption initiale des protéines est dictée par l'affinité des protéines pour la surface, qui varie en fonction à la fois des caractéristiques des protéines du milieu (charge, hydrophobicité, conformation, taille), de leur concentration et des propriétés de la surface (topographie, charge, hydrophobicité, composition chimique). Par exemple, la relativement faible thrombogénicité du PTFE par rapport au PET peut être attribuée à sa charge négative de surface, induisant une répulsion électrostatique des protéines du plasma qui sont globalement chargées négativement. En revanche, le PTFE et le PET étant tout deux hydrophobes, l'adsorption des protéines y est thermodynamiquement favorable (augmentation d'entropie) (Schmidt, Waldeck, & Kao, 2009). Notons qu'il est généralement impossible de tirer de règles générales étant donné que les protéines sont des structures multi-domaines, chacun possédant ses propres caractéristiques en termes de charge, hydrophobicité, *etc.* L'influence de la topographie sur l'adsorption de protéines est reconnue, en particulier si elle implique une surface de contact plus importante avec le liquide environnant et/ou si des motifs nanométriques, proches de la taille des protéines, sont présents. Il a notamment été montré que des trappes d'air pouvaient se loger dans les surfaces poreuses et/ou rugueuses, impliquées dans la faible adsorption de protéines sur les prothèses de PTFE (Xu et al., 2014).

Basées sur la compréhension du phénomène de thrombose et de l'influence des propriétés de surface, différentes stratégies ont été développées pour diminuer la thrombogénicité des prothèses de PET, PTFE ou PU. Elles sont basées sur l'utilisation de revêtements inhibant l'adsorption de protéines et donc de plaquettes (Figure 2-2-B), ainsi que sur l'emploi d'agents antiplaquettaires ou anticoagulants tels que l'aspirine ou la thrombomoduline. Ces derniers agissent directement sur la cascade de coagulation et peuvent être administrés en parallèle de l'intervention voire être incorporés et relargués par les prothèses. Plusieurs revues complètes détaillent ces différentes stratégies (Jordan & Chaikof, 2007; Kapadia et al., 2008; Li & Henry, 2011; van Lith & Ameer, 2011) et nous ne donnerons ici que quelques exemples approuvés cliniquement et/ou pertinents à notre étude.

2.2.3 Revêtements bioactifs

2.2.3.1 Héparine

L'héparine est un glycosaminoglycane (GAG) linéaire hautement sulfaté et hétérogène d'origine mammalienne (Baldwin & Kiick, 2010). Ce polysaccharide possédant des propriétés anticoagulantes a été fréquemment employé pour réduire la thrombogénicité de biomatériaux. Après l'obtention de résultats variables dépendamment de la méthode d'immobilisation, il est désormais reconnu qu'une immobilisation stable covalente de l'héparine est préférée (Hoshi et al., 2013; Li & Henry, 2011).

Deux prothèses avec un revêtement d'héparine sont approuvées par la FDA et actuellement disponibles en clinique : la prothèse en Dacron InterGard de la compagnie Maquet Cardiovascular (anciennement InterVascular Inc.) et la prothèse en PTFE Propaten (W.L. Gore & Associates Inc.) (Hoshi et al., 2013; Kapadia et al., 2008). Malgré des résultats initialement prometteurs, *in vitro* comme *in vivo*, l'intérêt des revêtements d'héparine est encore remis en question du fait que la prothèse InterGard n'a pas démontré une performance plus élevée que les prothèses classiques en PTFE au bout de 5 ans (Devine & McCollum, 2004).

Une limite à l'utilisation de l'héparine est la nécessité d'être en présence d'antithrombine III pour exercer son rôle inhibiteur de la thrombine (Li & Henry, 2011; van Lith & Ameer, 2011). D'autre part, l'héparine est fortement chargée négativement et différentes protéines peuvent s'y lier électrostatiquement (Yang, Tu, Wang, & Huang, 2012). Notamment les facteurs de croissance VEGF et bFGF présentent des sites de liaison à l'héparine et peuvent, une fois liés, interagir avec les cellules environnantes (Baldwin & Kiick, 2010; Li & Henry, 2011; Liang & Kiick, 2014). En particulier, l'interaction de l'héparine avec VEGF est exploitée pour l'immobilisation de VEGF sur les prothèses (Tableau 2-4).

2.2.3.2 Oxyde nitrique (NO)

L'oxyde nitrique (NO) est impliqué dans la régulation de la thrombose par les cellules endothéliales (Figure 2-3), mais aussi dans celle de la prolifération et migration des SMC, et donc de l'hyperplasie (Kapadia et al., 2008; Napoli & Ignarro, 2009). Dans ce contexte, certains groupes tentent d'imiter le rôle des EC en créant des matériaux capables de « sécréter » NO (Figure 2-2-B) (Andukuri et al., 2011; Kapadia et al., 2008; Taite, Yang, Jun, & West, 2008). Bien que des résultats

encourageants ait été observés dans des études animales, le quantité de NO incorporée est libérée au fur et à mesure et le rôle anti-thrombogène n'a une durée que limitée (Kapadia et al., 2008). Ce type de modification de prothèse ne s'est pas rendu au niveau clinique pour le moment.

2.2.4 Revêtements anti-adhésifs (*low-fouling*)

2.2.4.1 Revêtements synthétiques

Carbone Les revêtements de carbone ont été les premiers à être exploités pour réduire l'adhésion de plaquettes et l'adsorption de fibrine, et donc la thrombogénicité. Une prothèse de ePTFE avec un revêtement à base de carbone, le CarboFlo, a été approuvée par la FDA mais les résultats de l'étude clinique démontrent un rôle non significatif du revêtement sur la thrombogénicité (Jordan & Chaikof, 2007; Kapadia et al., 2008; van Lith & Ameer, 2011).

Polyéthylène glycol (PEG) Ce polymère est utilisé dans de nombreux domaines (*e.g.* livraison de gènes et médicaments, ingénierie tissulaire) pour ses propriétés hémocompatibles et anti-adhésives (*low-fouling*). Ces dernières sont dues à son hydrophilicité et à ses longues chaînes mobiles, permettant une forte hydratation de la surface – thermodynamiquement défavorable à l'adsorption de protéines, plaquettes et cellules – ainsi qu'une répulsion stérique de ces dernières (Chen, Li, Zhao, & Zheng, 2010; Martwiset, Koh, & Chen, 2006; Schmidt et al., 2009). Notons que les propriétés dépendent fortement des caractéristiques du revêtement employé (longueur et densité des chaînes de PEG (Michel, Pasche, Textor, & Castner, 2005; Zhu, Eurell, Gunawan, & Leckband, 2001)). Quelques études *in vitro* et *in vivo* ont été menées pour des applications vasculaires (Dimitrievska et al., 2011; Luo et al., 2013; Wei, Ji, Xiao, Lin, & Ji, 2011) mais il n'y a pas encore d'étude clinique à notre connaissance (Kapadia et al., 2008; van Lith & Ameer, 2011).

2.2.4.2 Polysaccharides naturels

La surface des EC est également une source d'inspiration pour le développement de revêtements anti-thrombogènes (Holland, Qiu, Ruegsegger, & Marchant, 1998; Li & Henry, 2011). Notamment, les EC sont recouvertes d'une brosse formée de polysaccharides, HSPGs et glycoprotéines, appelée la glycocalyx. Ainsi, certains polysaccharides ont été étudiés dans une démarche biomimétique et ont montré des propriétés anti-adhésives (*low-fouling*) intéressantes.

Les glycosaminoglycanes (GAG) sont une famille de polysaccharides d'origine mammalienne parmi lesquels on trouve le sulfate d'héparane (similaire à l'héparine) mais aussi l'acide

hyaluronique et le sulfate de chondroïtine (Baldwin & Kiick, 2010; Li & Henry, 2011). Bien que les propriétés anticoagulantes de l'héparine lui restent spécifiques, ces autres GAG sont eux aussi chargés négativement et ont démontré un potentiel pour empêcher l'adhésion de protéines du plasma (majoritairement anioniques) et de plaquettes (Keuren et al., 2003). Le sulfate de chondroïtine est ainsi envisagé comme revêtement dans le développement d'implants vasculaires (Charbonneau et al., 2012; Lequoy, Liberelle, De Crescenzo, & Lerouge, 2014).

Le dextrane est un (1→6)- α -D-glucose linéaire, avec quelques branchements (1→3) le long de sa chaîne (5%) issu de microorganismes (de Belder, 2000; Heinze, Liebert, Heublein, & Hornig, 2006). Ce polysaccharide naturel et non toxique est notamment utilisé comme substitut de plasma, anticoagulant (sulfate de dextrane) ainsi que comme revêtement de biocapteurs (dextrane carboxyméthylé) et composant principal de colonnes de dessalage (de Belder, 2000; Heinze et al., 2006). Il a été montré que le dextrane prévenait l'adsorption de protéines et de cellules, notamment du fait de sa neutralité et de son caractère fortement hydrophile, similairement au PEG (Baldwin & Kiick, 2010; Holland et al., 1998; Martwiset et al., 2006; Österberg et al., 1993). De même que pour le PEG, les propriétés anti-adhésives (*low-fouling*) d'un revêtement de dextrane varient avec la densité et la conformation du polymère en surface (liée notamment à son nombre de points d'attache avec la surface) (Martwiset et al., 2006; McArthur et al., 2000). Comme tous les polysaccharides non-mammaliens, le dextrane est à la fois peu coûteux et disponible dans une large gamme de poids moléculaires, ce qui le rend intéressant pour la formation de bioconjugués, particules, hydrogels ou revêtements pour le secteur biomédical (Baldwin & Kiick, 2010; Martwiset et al., 2006).

2.3 Endothélialisation

Parmi les nombreux rôles des cellules endothéliales (EC) de l'intima, on trouve la régulation de la coagulation, de l'activation et de l'adhésion plaquettaire (Figure 2-3) ainsi que de la fibrinolyse (Li & Henry, 2011; Nachman, 2012). Les EC secrètent ainsi de nombreux facteurs tels que NO et PGI₂ – prévenant l'activation plaquettaire mais aussi l'hyperplasie des SMC – ainsi que des anticoagulants tels que la thrombomoduline ou l'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire (Chan-Park et al., 2009).

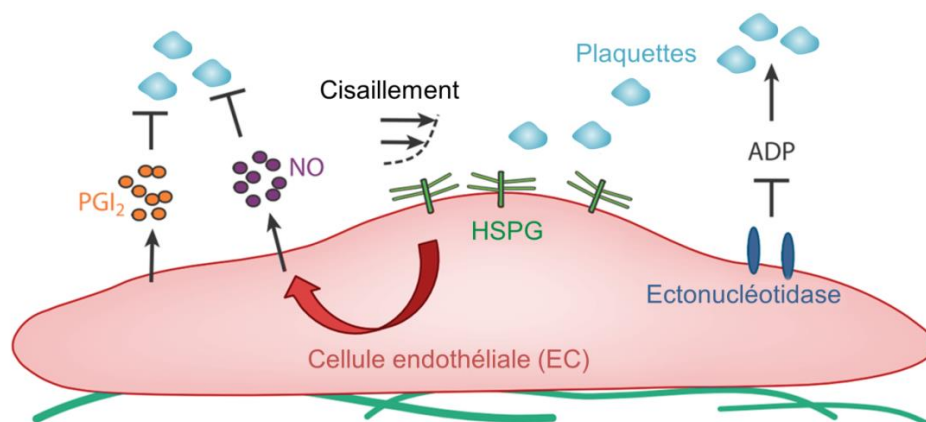


Figure 2-3 : Régulation de l'adhésion et de l'activation plaquettaire par les cellules endothéliales (adapté de (Li & Henry, 2011)).

Le tissu endothélial constitue donc l'interface idéale entre le sang et le matériau dont est composée la prothèse. La colonisation de cette dernière par les cellules endothéliales, que ce soit *in situ* et/ou *in vitro*, est ainsi un des objectifs centraux lors de la conception de ce type d'implants.

2.3.1 Endothélialisation *in vivo*

Trois types d'endothélialisation pouvant se produire *in vivo* ont été identifiées.

L'endothélialisation transanastomotique, c'est-à-dire à partir des extrémités de la prothèse. Cependant, celle-ci n'excède pas 5 à 20 mm sur des prothèses synthétiques (non modifiées) même après une implantation prolongée (plusieurs années) (Vindigni, Abatangelo, & Bassetto, 2011; Zilla et al., 2007) .

L'endothélialisation transmurale est favorisée par l'utilisation de matériaux très poreux et demeure absente pour les prothèses actuelles où la largeur des pores est limitée par le maintien de l'étanchéité (Zilla et al., 2007). De plus, la potentielle migration transmurale des SMC serait problématique puisque contribuant à l'hyperplasie néointimale (van Lith & Ameer, 2011).

Ces deux voies sont plus favorables chez certaines espèces animales, d'autant plus que les prothèses implantées sont plus courtes, et sont à l'origine des résultats trompeurs obtenus lors d'essais animaux (Chan-Park et al., 2009; van Lith & Ameer, 2011; Vara et al., 2005; Zilla et al., 2007).

L'endothélialisation réparatrice intervient dans le cas de petites lésions vasculaires et est également lente pour les prothèses vasculaires classiques. Cependant, elle fait intervenir des

cellules endothéliales progénitrices (EPC) circulant dans le sang, présentant un grand intérêt à la fois en tant que source des cellules pour l'ensemencement *in vitro* que pour le potentiel recrutement *in situ* (cf. partie suivante).

2.3.2 Ensemencement *in vitro*

La lenteur de l'endothélialisation *in vivo* a initié la recherche de nouvelles stratégies pour former un endothélium à la surface des prothèses. Imaginé par Herring et collègues (Herring et al., 1979), un recouvrement avec des cellules endothéliales préalable à l'implantation de la prothèse est une voie envisageable, qui a été, et est encore, beaucoup étudiée (Campbell & Campbell, 2007; de Mel et al., 2008; Pankajakshan & Agrawal, 2010). Ces études ont montré qu'une couche confluyente de cellules endothéliales formée *ex situ* pouvait diminuer significativement les complications liées à la thrombogénicité des implants *in vivo*.

Plusieurs défis se présentent alors, dont les idées sont résumées sur la Figure 2-4, et dont nous discuterons dans cette partie.

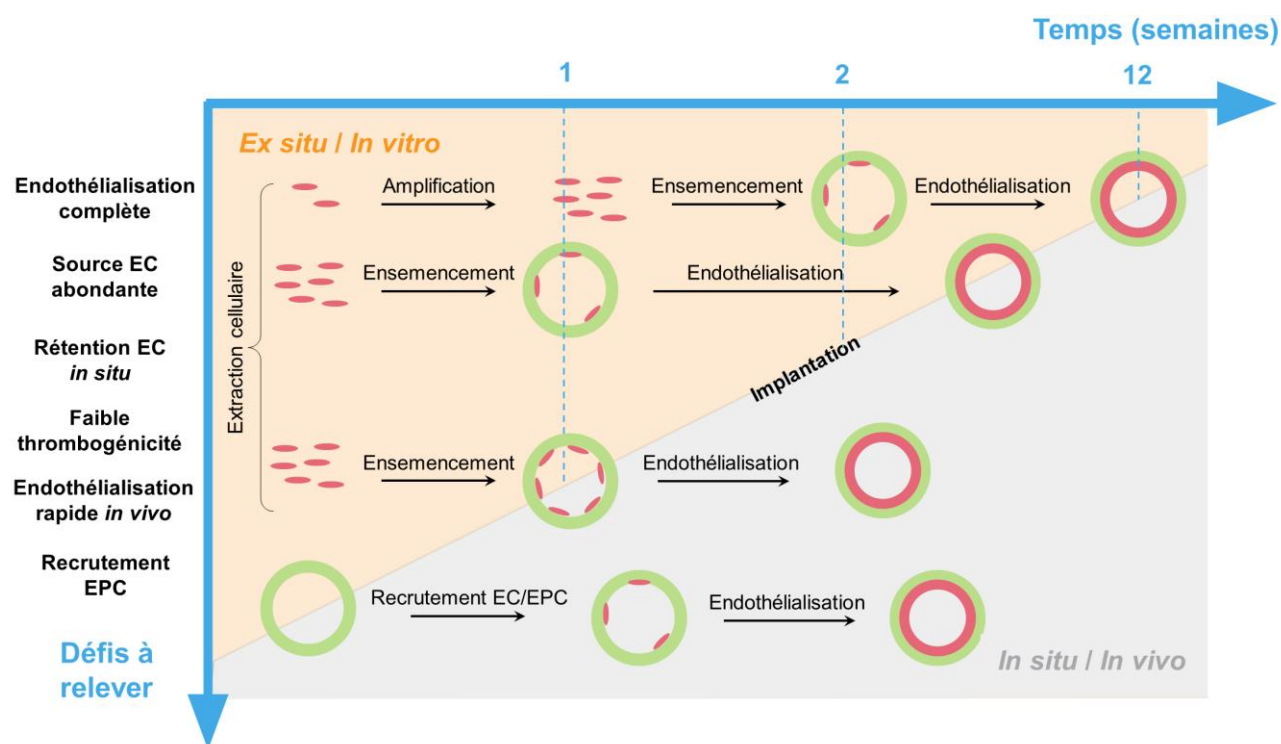


Figure 2-4 : Stratégies d'endothélialisation de prothèses vasculaires et défis associés.

2.3.2.1 Sources de cellules

L'identification de sources de cellules endothéliales pertinentes, en termes de quantité, de facilité d'extraction, de disponibilité et de chirurgie associée, constitue un domaine de recherche à part entière (Campbell & Campbell, 2007; Nemen-Guanzon et al., 2012).

Notons tout d'abord qu'il est nécessaire d'utiliser des cellules autologues pour éviter tout rejet par l'organisme (Campbell & Campbell, 2007). Ainsi, les premières sources de cellules endothéliales utilisées ont été naturellement les veines et artères du patient, accessibles par chirurgie (Vara et al., 2005). Cependant, les cellules issues de vaisseaux sanguins adultes sont complètement différenciées, ce qui diminue fortement leur capacité à proliférer (Sorrentino & Haller, 2011). Des questions se posent également quant à la vitalité des cellules des patients cardiaques, donc susceptibles de provenir de populations diabétiques, fumeuses, *etc.* (Campbell & Campbell, 2007). L'emploi de cellules souches capables de se différencier en cellules vasculaires est apparu alors plus pertinent.

Diverses sources de cellules souches existent, avec les mêmes obstacles que les sources de cellules endothéliales : l'accessibilité chirurgicale et la disponibilité en nombre des cellules en question. Parmi celles-ci, on retrouve la moelle osseuse, les tissus adipeux, les tissus embryonnaires et les cordons ombilicaux, mais aussi le sang lui-même (Nemen-Guanzon et al., 2012). Depuis leur identification en 1997 (Asahara et al., 1997), les cellules progénitrices circulant dans le sang depuis la moelle osseuse (EPC) ont suscité un intérêt croissant, à la fois pour l'endothélialisation *in vitro* mais aussi pour leur mobilisation directe *in situ*.

“An emerging philosophy in tissue engineering is that rather than attempting to recreate the complexity of living tissues *ex vivo*, we should aim to develop synthetic materials that establish key interactions with cells in ways that unlock the body's innate powers of organization and self-repair.” (Place, Evans, & Stevens, 2009)

La mobilisation des EPC *in situ* vers le site d'implantation a été étudiée au moyen de différents facteurs et protéines libérées de manière contrôlée par la prothèse (4^{ème} ligne Figure 2-4) (Avci-Adali, Ziemer, & Wendel, 2010; Chen, Wu, Zhang, Zhang, & Sun, 2011; de Mel et al., 2008; Melchiorri, Hibino, & Fisher, 2013). De nombreux défis sont à relever par ces constructions complexes puisqu'il s'agit de permettre l'attraction de cellules, leur adhésion, leur différenciation et leur prolifération, dans des délais limités et ce malgré le faible nombre d'EPC circulantes. De plus, différentes sous-populations d'EPC ont été identifiées, pouvant se différencier en divers types

cellulaires. Des études sont encore nécessaires pour comprendre le rôle de chaque population *in vivo*, identifier les marqueurs nécessaires à leur recrutement et contrôler leur différenciation spécifique en EC (Avci-Adali et al., 2010; Melchiorri et al., 2013).

Étant donnée la lenteur et la complexité de cette endothélialisation in situ, il convient d'étudier tout d'abord le phénomène in vitro pour juger de son efficacité et de sa rapidité.

2.3.2.2 Durée du processus

Deux stratégies principales sont employées pour l'ensemencement avec les cellules recueillies (1^{ère} et 2^{ème} lignes, Figure 2-4). Elles se distinguent par la nécessité d'une culture cellulaire préalable à l'ensemencement proprement dit, visant à amplifier le nombre de cellules déposées (1^{ère} ligne Figure 2-4). Cette dernière stratégie a montré son efficacité au niveau d'études cliniques (Chan-Park et al., 2009; Vara et al., 2005). Cependant, l'ensemencement direct des prothèses introduit des contraintes plus élevées quant au nombre de cellules à extraire de la source sélectionnée.

La procédure d'endothélialisation *in vitro* demande beaucoup de temps (environ 10 semaines) et d'expertise (bioréacteur), rendant la mise en place coûteuse et limitant le système à des centres spécialisés (Campbell & Campbell, 2007; Chan-Park et al., 2009; de Mel et al., 2008; Vara et al., 2005). C'est pourquoi l'idée d'utiliser le corps humain comme bioréacteur et d'implanter la prothèse « pré-ensemencée » afin que l'endothélialisation s'opère *in situ* est très attractive (3^{ème} ligne Figure 2-4). Un des défis majeurs pour cette stratégie est d'éviter le détachement des cellules « pré-ensemencées » du fait du cisaillement (Kawahara & Matsuda, 2012).

Quelle que soit la stratégie d'endothélialisation choisie, il apparaît nécessaire de modifier les prothèses de façon à leur conférer des propriétés permettant l'adhésion efficace des cellules ensemencées, ainsi que leur prolifération et leur rétention in situ, pour tenter in fine de diminuer la durée de préparation de la prothèse pré-implantation.

2.3.3 Favoriser l'endothélialisation

L'initiation de l'angiogenèse se fait par la formation de tubes d'endothélium qui donneront naissance aux nouveaux vaisseaux. Dans ce processus, l'adhésion des cellules endothéliales à la matrice extracellulaire (ECM), ainsi que leur prolifération et migration au sein de celle-ci, sont cruciales. Source d'inspiration pour le génie tissulaire, l'ECM constitue un environnement physicochimique complexe en intime contact avec les cellules (Figure 2-5).

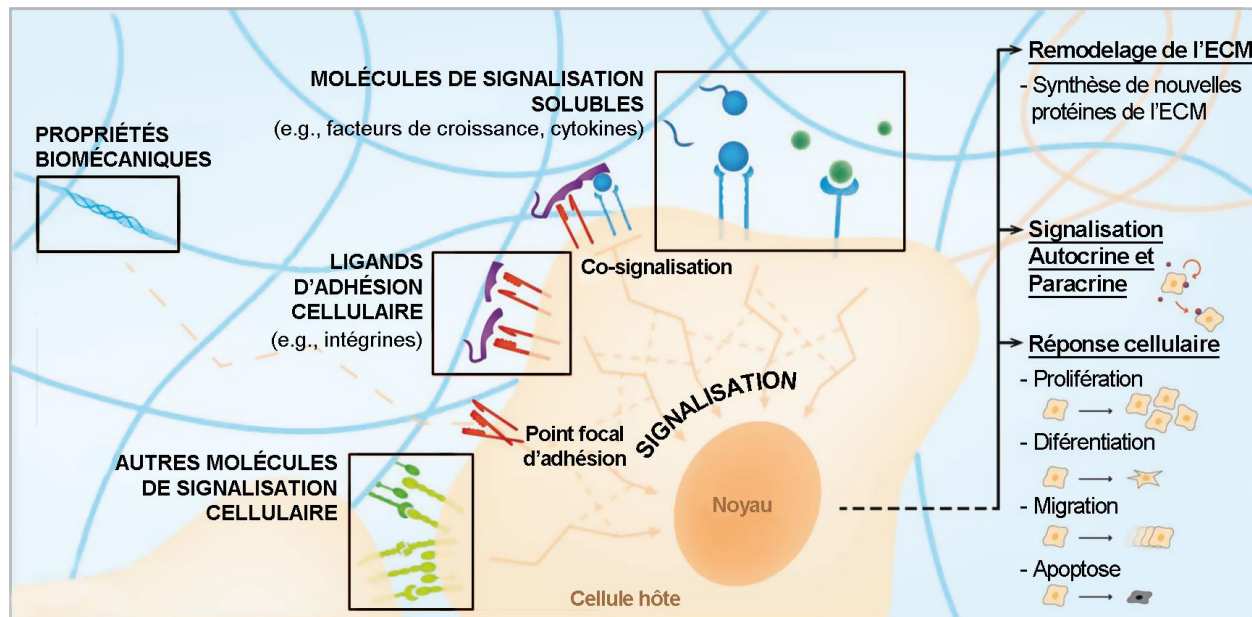


Figure 2-5 : Environnement extracellulaire et multiples signaux biomoléculaires (Rice et al., 2013).

L'organisation spatiale ainsi que les caractéristiques biochimiques de divers composants de l'ECM déterminent le comportement mécanique et cellulaire, ainsi que l'organisation hiérarchique des tissus. D'une manière générale, les caractéristiques de l'ECM telles que la topographie nanométrique, les propriétés mécaniques et les composants-clés d'une interaction spécifique avec les cellules sont ainsi imitées et définissent les modifications à apporter aux prothèses vasculaires (de Mel et al., 2008).

2.3.3.1 De l'ECM aux peptides d'adhésion

Les propriétés physiques de la structure polymère, notamment sa porosité, sont en partie définies par imitation de la structure de l'ECM. Par exemple, l'empilement des fibres sur la face luminale des structures de PET présentées en partie 2.1.3 a été conçu pour favoriser l'orientation préférée des cellules endothéliales, *i.e.* dans la direction du flux sanguin. Cependant, l'ECM ne se résume pas à sa structure, elle présente également de nombreuses protéines comme la fibronectine, la vitronectine, le collagène et la laminine. Ces ligands interagissent avec des récepteurs cellulaires tels que les intégrines (composées d'une paire de sous-unités α et β , Figure 2-6-B) et permettre l'adhésion cellulaire (de Mel et al., 2008; Hynes, 2007). Comme représenté sur la Figure 2-6-B, la formation de points focaux d'adhésion (FA), sites d'attachement entre les cellules et l'ECM, est liée à l'activation de ces intégrines ainsi qu'à une réorganisation complexe du cytosquelette (Bacakova, Filova, Parizek, Ruml, & Svorcik, 2011; Hynes, 2007; Mitra, Hanson, & Schlaepfer, 2005).

Pour munir des biomatériaux synthétiques de propriétés adhésives, on utilise souvent la séquence peptidique RGD, présente au sein des protéines adhésives de l'ECM et favorisant à elle-seule l'adhésion cellulaire (Delaittre, Greiner, Pauloehrl, Bastmeyer, & Barner-Kowollik, 2012). L'utilisation de peptides, plutôt que de protéines de l'ECM au complet, présente de nombreux avantages, au-delà de leur simplicité permettant une synthèse aisée (Collier & Segura, 2011). La synthèse d'oligopeptides constitue une solution aux effets indésirables associés à l'introduction de protéines naturelles (*e.g.* réaction immunitaire, risque d'infection) (Bellis, 2011). De plus, les différentes fonctions des protéines peuvent être encore mal connues et l'utilisation de séquences peptidiques choisies permet un meilleur contrôle des conséquences sur le comportement cellulaire. Par exemple, la fibronectine aurait également un rôle d'activation plaquettaire, non désirable dans notre cas, qui n'est pas observé avec la séquence RGD seule (de Mel et al., 2008).

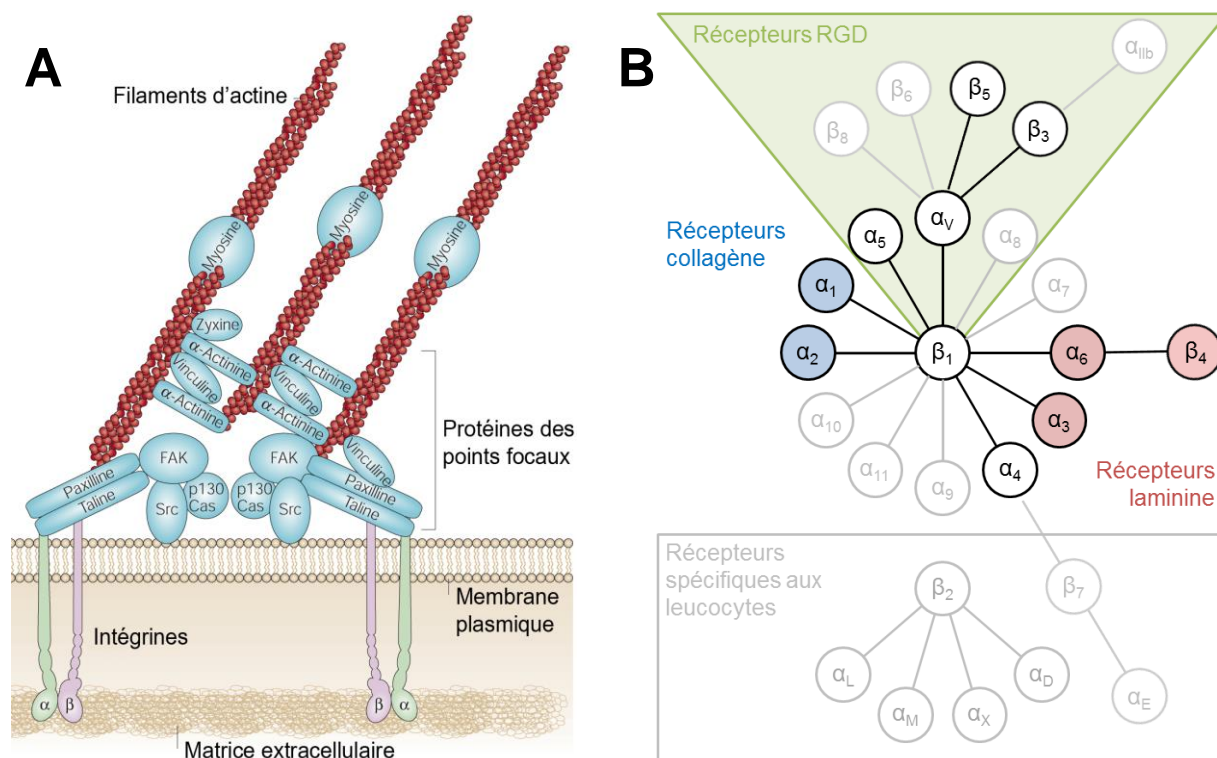


Figure 2-6 : (A) Points focaux d'adhésion (adapté de (Mitra et al., 2005)) et (B) intégrines (adapté de (Hynes, 2007)). Les intégrines absentes sur les cellules endothéliales sont grisées.

En ayant à l'esprit que l'endothélialisation pourrait rester incomplète au moment de l'implantation (ou que l'on souhaite recruter les EPC *in situ*, cf. Figure 2-4), la surface de la prothèse devra présenter des biomolécules permettant l'adhésion spécifique de EC ou EPC tout en restant thromborésistante et hémocompatible (Melchiorri et al., 2013; Ren et al., 2015). Dans ce contexte, la séquence RGD présente un manque de spécificité problématique, notamment vis-à-vis de l'adhésion des plaquettes (notamment via l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Ni & Freedman, 2003), cf. Figure 2-6-B et Figure 2-2-A) mais aussi des SMC impliquées dans l'hyperplasie.

Cette non-spécificité a amené de nouvelles études pour sélectionner des séquences peptidiques spécifiques à un type cellulaire (Tableau 2-3), en se basant sur les intégrines présentes sur les différents acteurs (EC, SMC et plaquettes) ainsi que les ligands associés (Tableau 2-2).

Tableau 2-2 : Intégrines des cellules vasculaires et ligands.

Intégrines	EC	SMC	Plaquettes	Ligands	
				Protéines	Peptides
$\alpha_1\beta_1$	+	+		LN, COL	
$\alpha_2\beta_1$	+	+	+	LN, TSP, COL	
$\alpha_3\beta_1$	+	++		LN, TSP	
$\alpha_4\beta_1$	+	-		TSP, FN, OSP	REDV, LDV
$\alpha_5\beta_1$	+	++	+	FN, OSP	RGD
$\alpha_6\beta_1$	+	-	+	LN	
$\alpha_7\beta_1$				LN	
$\alpha_8\beta_1$		+	+	FN, OSP, VN	RGD
$\alpha_9\beta_1$				OSP	LDV
$\alpha_{10}\beta_1$				LN, COL	
$\alpha_{11}\beta_1$				COL	
$\alpha_4\beta_7$				FN, OSP	
$\alpha_6\beta_4$	+	-		LN	
$\alpha_v\beta_1$	+	+		FN, OSP	RGD
$\alpha_v\beta_3$	+	+	+	TSP, FN, OSP, VN, vWF, FG	RGD
$\alpha_v\beta_5$	+	+		OSP, VN	RGD
$\alpha_v\beta_6$				FN, OSP	RGD
$\alpha_v\beta_8$					RGD
$\alpha_{IIb}\beta_3$			++	TSP, FN, VN, vWF, FG	RGD
$\alpha_E\beta_7$					LDV
$\alpha_D\beta_2$					LDV
$\alpha_L\beta_2$					LDV
$\alpha_M\beta_2$				FG	LDV
$\alpha_X\beta_2$				FG	LDV
Références	(Hynes, 2007)	(Moiseeva, 2001)	(Ni & Freedman, 2003)	(Humphries, Byron, & Humphries, 2006)	

Le Tableau 2-3 résume les différentes études impliquant des peptides spécifiques aux cellules endothéliales. La séquence REDV, dérivée de la fibronectine, a été identifiée comme spécifique aux EC (Hubbell, Massia, Desai, & Drumheller, 1991). Cette sélectivité est liée à son interaction spécifique avec les intégrines $\alpha_4\beta_1$ (Massia & Hubbell, 1992), abondantes sur les EC mais rares sur les SMC (Plouffe et al., 2007; Wei et al., 2011) ainsi que sur les plaquettes (Ni & Freedman, 2003) (Tableau 2-2). La séquence YIGSR, dérivée de la laminine, a également été envisagée et a démontré une certaine spécificité par rapport aux plaquettes et aux SMC. Kanie *et al.* ont récemment entrepris une étude visant à trouver une séquence peptidique spécifique aux EC par rapport aux autres cellules vasculaires (SMC, fibroblastes) (Kanie et al., 2012; Kuwabara et al., 2012). À partir de l'hypothèse qu'une telle séquence devait exister au sein du collagène de type IV de l'interface media/intima (*cf.* partie 1.2.1), le tripeptide CAG a ainsi été identifié et testé avec succès *in vitro* et *in vivo* (Kanie et al., 2012; Kuwabara et al., 2012).

Tableau 2-3 : Peptides sélectifs aux EC vs plaquettes et SMC.

	Référence	Substrat	Peptide	Tests où rôle sélectif du peptide observé	Base low-fouling	Contrôle mutant	Co-culture	<i>in vivo</i> ?	Intérêt (- / + / ++)
Peptides spécifiques aux EC vs plaquettes	(Khan et al., 2015)	PCU + PEGMA Méthodes de greffage variées	CAG	Adhésion	✓				++
	(Ji et al., 2012)	Polymère zwitterionique déposé sur verre	REDV	Adhésion	✓				++
	(Ceylan, Tekinay, & Guler, 2011)	Peptides amphiphiles sur acier inox.	REDV	Adhésion					+
	(Andukuri et al., 2011)	PCL électrofilé	YIGSR	Adhésion					+
	(Taite et al., 2008) ³	Films de PU modifiés	YIGSR (+PEG)	Adhésion	✓				+
	(Jun & West, 2005) ³	Films de PU modifiés	YIGSR (+PEG)	Adhésion	✓				+
	(Hubbell et al., 1991)	Verre	REDV	Étalement					-

³ Même groupe

Peptides spécifiques aux EC vs SMC	(Khan et al., 2015)	PCU + PEGMA Méthodes de greffage variées	CAG	Adhésion Prolifération	✓		✓		++
	(Kuwabara et al., 2012) ⁴	PCL électrofilé avec CAG	CAG	Implantation				✓	+
	(Kanie et al., 2012) ⁴	PCL électrofilé avec CAG	CAG	Adhésion					+
	(Wei et al., 2013) ⁵	Copolymères PMSN	REDV	Adhésion Migration Implantation	✓		✓	✓	+
	(Lin, Hou, Ren, & Ji, 2012) ⁵	Héparine/ Chitosane (LbL)	REDV	Adhésion		✓			++
	(Ji et al., 2012) ⁵	Polymère zwitterionique déposé sur verre	REDV	Adhésion Prolifération Migration Relargage NO	✓	✓	✓		++
	(Wei et al., 2011) ⁵	Copolymères HEMA- PEGMA	REDV (+PEG)	Adhésion Prolifération	✓		✓		+
	(Ceylan et al., 2011)	Peptides amphiphiles sur acier inox.	REDV	Adhésion Étalement					+
	(Andukuri et al., 2011)	PCL électrofilé	YIGSR	Adhésion					+
	(Taite et al., 2008)	Films de PU modifiés	YIGSR (+PEG)	Adhésion	✓				-
	(Plouffe et al., 2007)	Cellule microfluidique (PDMS)	REDV	Adhésion Cisaillement			✓		++
	(Fittkau et al., 2005)	Hydrogels PEG	YIGSR (+ RGD)	Migration	✓				-
	(Hubbell et al., 1991)	Verre	REDV	Étalement					-

⁴ Même groupe

⁵ Même groupe

2.3.3.2 Des voies de signalisation à VEGF

La prolifération et migration cellulaire va être induite par différents signaux, provenant de l'ECM et des cellules environnantes (Martino et al., 2015; Rice et al., 2013). La coordination de diverses cascades de phosphorylation, incluant les voies MAPK, PI3K/Akt et FAK/Src régulent la prolifération, la survie et la migration des EC, respectivement (Hung, Wu, Chien, & Hsu, 2009). Lors de l'angiogenèse, la voie de signalisation Notch est également impliquée dans la régulation de la croissance et la formation de l'endothélium (Herbert & Stainier, 2011). Le récepteur VEGFR-2 (anciennement nommé KDR ou Flk-1) joue un rôle prépondérant dans l'activation des voies suscitées, par son interaction avec la famille des facteurs de croissance endothéliaux vasculaires (VEGF) (Figure 2-7) (Ferrara, Gerber, & LeCouter, 2003; Martino et al., 2015; Olsson, Dimberg, Kreuger, & Claesson-Welsh, 2006; Shen, Shoichet, & Radisic, 2008). VEGF₁₆₅, isoforme de VEGF-A, est la forme prépondérante du facteur de croissance et son interaction avec VEGFR-2 en fait une molécule de choix pour favoriser la ré-endothélialisation (Hutchings, Ortega, & Plouët, 2003; Murschel et al., 2013). C'est l'isoforme le plus utilisé dans les études utilisant VEGF dans des applications similaires à celles-ci (Tableau 2-4).

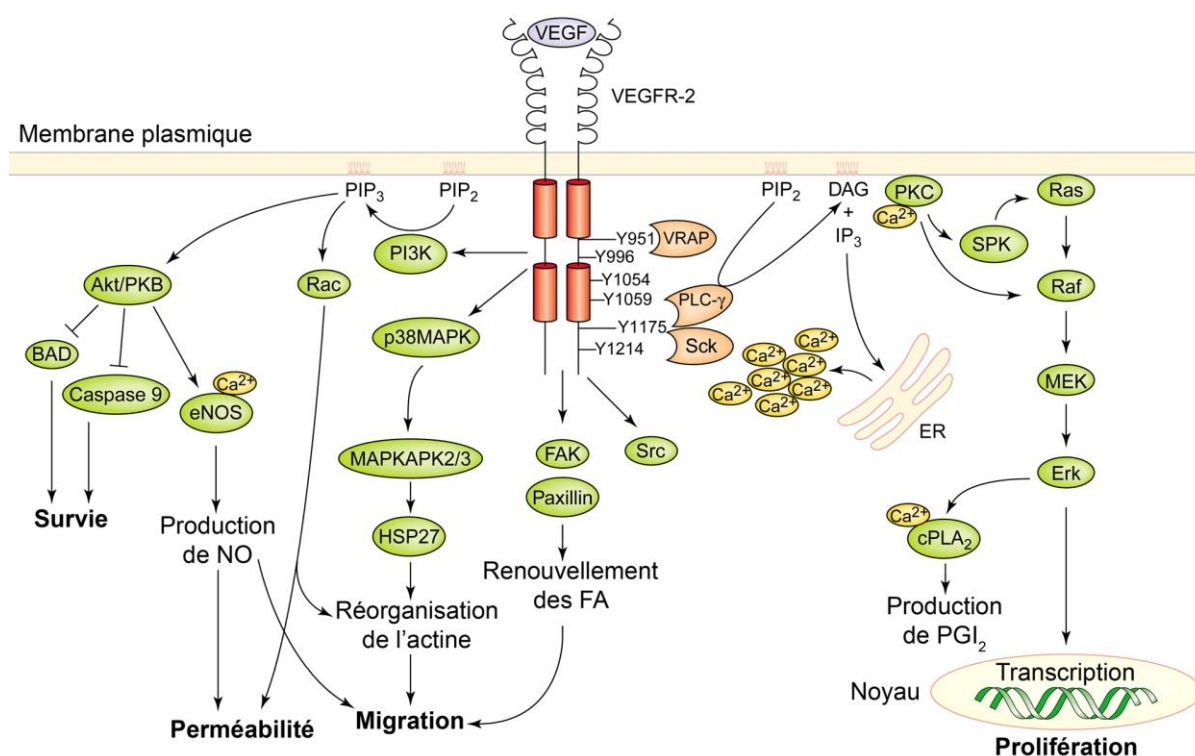


Figure 2-7 : Voies de signalisation induite par l'activation de VEGFR-2 par VEGF (adapté de (Cross, Dixelius, Matsumoto, & Claesson-Welsh, 2003)).

De nombreux groupes utilisent VEGF pour favoriser la vascularisation (vasc.) ou l'endothélialisation (end.) (Tableau 2-4). Dans la plupart des cas, des effets notables sur la prolifération et la migration, et parfois sur l'adhésion, sont observés. La majorité des études emploient un greffage covalent de VEGF, tel qu'il serait appliqué à une prothèse pour un effet localisé, et démontrent que VEGF conserve sa bioactivité dans cet état immobilisé. Certaines différences sont observées néanmoins en fonction de la stratégie de greffage employée, ce qui sera discuté en partie 2.5.2.

D'autre part, VEGFR-2 est également présent à la surface des EPC, et VEGF est utilisé pour favoriser à la fois leur recrutement (Kawahara & Matsuda, 2012) et leur différenciation en cellules endothéliales (Matsuda et al., 2013).

L'action de VEGF devrait être limitée aux cellules endothéliales puisque les SMC ainsi que les fibroblastes ne présentent pas de récepteurs VEGFR-2 (Asahara et al., 1995; Berk, 2001). De plus, il a été rapporté que VEGF induisait une réduction de l'hyperplasie néointimale par les EC (Asahara et al., 1995; Dorafshar et al., 2003; Zachary, Mathur, Yla-Herttuala, & Martin, 2000; Zhou et al., 2009). Ce dernier point, fournissant un intérêt supplémentaire à VEGF pour notre application, est cependant controversé. Les productions de NO et de PGI₂ induites par VEGF dans les cellules endothéliales (Figure 2-7) vont effectivement dans le sens d'une réduction de la prolifération des SMC (Cross et al., 2003; Zachary et al., 2000). Il a été également observé que VEGF pouvait inhiber la prolifération des SMC induite par PDGF (Dorafshar et al., 2003). Cependant, certaines études ont observé une croissance des SMC en présence de VEGF, attribuée au fait que celui-ci régule la production de facteurs de croissance (FGF et TGF- β) par les EC (cf. partie 2.4.2) (Li et al., 2009; Randone et al., 2005).

Tableau 2-4 : Stratégies incluant l'immobilisation de VEGF pour favoriser l'endothélialisation (End.) de prothèses vasculaires ou la vascularisation (Vasc.) de structures pour le génie tissulaire.

Référence	But	Substrat	Isoforme	Stratégie de greffage de VEGF	Caractérisation greffage et densité résultante	Tests où effet de VEGF observé	In vivo	Remarques (gVEGF/sVEGF : VEGF greffé/soluble)
(Galas & Liu, 2014)	Vasc.	Plaque à puits	h	Covalent (EDC/NHS)	ELISA direct 0.04 à 18.6 ng/cm ²			Pas d'effet de gVEGF sur prolifération
(Guex et al., 2014)	Vasc.	PCL électrofilé + plasma	h165	Covalent (EDC/NHS)	Immuno-coloration ELISA indirect 700 ng/cm ²	Interaction VEGFR-2 Prolifération		Influence de la lignée et de la morphologie de la structure
(Wu, Fu, & Cai, 2014)	Vasc.	Silicon wafer APTES	h	Covalent (EDC/NHS)	XPS Immuno-coloration ELISA indirect 54 à 132 ng/cm ²	Migration		Gradient
(Wang et al., 2013)	End.	Titane recouvert de PEI		LbL Héparine/VEGF	SPR	Prolifération		Adhésion plaquettaire
(Traub et al., 2013)	Vasc.	Plaques à puits	h165	Adsorption chimère Fn-VEGF	ELISA direct	Adhésion Étalement Vasc.	✓	Implication intégrines Points focaux
(Z. Yang et al., 2012)	End.	<u>Acier 316L + Héparine</u>	h	Adsorption	<u>XPS, FTIR, OCM-D</u> 60 ng/cm ²	-	✓	Pas d'effet de VEGF sur adhésion et prolifération
(Yang et al., 2013)		Plasma NH ₂ + acide gallique		Covalent (NHS/EDC)	76 ng/cm ²	-		Co-immob. anti-CD34
(Luo et al., 2013)		Polydopamine		Covalent (quinone-NH ₂)	78.5 ng/cm ²	Adhésion et prolifération		PEG testé pour hémocompatibilité
(Liu et al., 2014)		Polydopamine		Greffage covalent de NP VEGF/Hep/PLL	ELISA	Adhésion prolif., migration		EC et EPC
(Zhang et al., 2013)	End.	Construction de PELCL électrofilé	h165	Chargement pendant électrofilage	ELISA 1 ng/mg	Adhésion Prolifération End.	✓	Relargage VEGF (et PDGF) ⇒ prolif. SMC et hyperplasie Construction complexe
(Phelps, Headen, Taylor, Thulé, & García, 2013)		Gels de PEG	h165	Covalent via maleimide	ELISA 10 µg/mL	Vasc.	✓	Greffage covalent de VEGF douteux car pas de SH libre Co-immob. avec RGD

(Kawahara & Matsuda, 2012) (Matsuda et al., 2013)	End.	Verre APTES Revêtement PEVA	h165	Covalent (EDC/NHS) Covalent (via NH ₂)	ELISA direct FITC-albumin	Adhésion Étalement Expression VEGFRs		EPC, points focaux Effet cisaillement VEGF vs anti-VEGFR Substrats variés (verre, acier inox. et PU électrofilé)
(Yu et al., 2012)	Vasc.	Plaques à puits	h165	Adsorption de VEGF-Fc	ELISA indirect 57 ng/cm ²	Adhésion Prolifération		
(Oliviero, Ventre, & Netti, 2012)	Vasc.	Gels de PEG + héparine	h165	Adsorption	ELISA indirect 665 ng/mL	Vasc.	CAM	Relargage VEGF Ajout RGD pour adhésion
(Shin et al., 2012)	End.	Films de PLCL + revêtement de dopamine		Covalent (quinone-NH ₂)	ELISA indirect et direct 20 et 200 ng/cm ²	Migration Prolifération		Pas d'effet sur l'adhésion Effet VEGF = bFGF
(Poh, Shi, Lim, Neoh, & Wang, 2010) (Hu, Neoh, Zhang, Kang, & Wang, 2012)	Vasc.	<u>Feuillet titane + revêtement :</u> - dopamine (D) - HA-D - héparine-D	h	Covalent (quinone-NH ₂) Covalent EDC/NHS Adsorption	<u>ELISA indirect + XPS</u> 26 ng/cm ² 41.6 ng/cm ² 45 ng/cm ²	Adhésion Prolifération Différentiation MSC Vasc.		Adsorption héparine > greffage covalent sur HA, discuté en termes de conformation
(Porter, Klinge, & Gobin, 2011a) (Porter, Klinge, & Gobin, 2011b)	Vasc.	Gels de PEG	165	Covalent (EDC/NHS)	N.D.	Prolifération Migration Survie ERK, Src et Akt		Pas de caractérisation des gels et du greffage Co-immob. RGD Comp. HUVEC et HMEC Voies de signalisation gVEGF ≥ sVEGF
(Shen et al., 2008) (Chiu & Radisic, 2010) (Odedra, Chiu, Shoichet, & Radisic, 2011) (Miyagi et al., 2011)	Vasc.	Gels de collagène	m165	Covalent (EDC/NHS)	ELISA direct 40 et 110 ng/mL ELISA indirect 750 ng/mL Digestion + ELISA 3 à 10 ng/mL ELISA indirect 200 et 1300 ng/mL	Prolifération Vasc. Migration Vasc.	- CAM - ✓	gVEGF > sVEGF Synergie Ang1 Effet d'un gradient de VEGF
(Anderson, Chen, Iruela-Arispe, & Segura, 2009)	Vasc.	Verre + revêtement or et héparine	165	Adsorption ou covalent (photo-immobilisation NH ₂)	SPR + ELISA direct 100 pg/cm ²	Prolifération VEGFR-2		Relargage VEGF gVEGF < sVEGF

(Zhou et al., 2009)	End.	Prothèses décellularisées	h165	Adsorption sur héparine	ELISA indirect 2 à 10 ng/disque (Ø5mm)	Prolifération Perméabilité	✓	Relargage VEGF ↗ ré-endothélialisation ↘ hyperplasie
(Leslie-Barbick, Moon, & West, 2009)	Vasc.	Gels de PEG	165	Covalent (EDC/NHS)	ELISA indirect 19 pmol/cm ² (= 855 ng/cm ²)	Vasc. Migration		Co-immob. RGD gVEGF > sVEGF
(Sharon & Puleo, 2008)	End. & Vasc.	Verre + revêtement de PLGA	h165	Covalent VEGF-COOH oxydé	MicroBCA, ELISA direct, interaction avec VEGFR-2	Prolifération		Stratégie de greffage élégante Influence de l'espaceur gVEGF < sVEGF
(Liu, Ratner, Sage, & Jiang, 2007)	Vasc.	Verre + revêtement d'or	h165	Covalent (EDC/NHS)	XPS et SPR (avec Fn seulement)	Migration		Migration (libre) en présence d'un gradient
(Backer, Patel, Jehning, Claffey, & Backer, 2006)	End.	Plaques à puits	h121	Adsorption complexe Fn-VEGF	Clivage puis WB 0.056 à 5.6 pmol/cm ² (= 2.5 à 250 ng/cm ²)	Prolifération 293/KDR		Design élégant de Fn-VEGF Pas de prolifération des PAE/KDR
(Koch et al., 2006)	Vasc.	Matrice de collagène	h165	Covalent (NHS-PEG-NHS)	N.D.	Prolifération Vasc.	CAM	Relargage VEGF Manque contrôle sVEGF
(Ito, Hasuda, Terai, & Kitajima, 2005)	Vasc.	Verre ou PS + revêtement de gélatine	h121	Covalent (Photo- immobilisation NH ₂)	Interaction VEGFR-2 puis immuno- coloration	Prolifération		Dose-dépendante Inhibée si anti-VEGF
(Crombez et al., 2005)	End.	PTFE fonctionnalisé	h165	Électrostatique	ELISA direct	Migration		Pas d'effet sur l'adhésion
(Randone et al., 2005)	End.	Prothèses PTFE	h	ECM (Matrigel) contenant VEGF	N.D.	Implantation	✓	↗ ré-endothélialisation ↗ hyperplasie
(Hutchings et al., 2003)	End.	Plaques à puits	h121 h165 h189	Adsorption	N.D. (données non représentées)	Adhésion Migration Survie		Comparaison des isoformes Points focaux Preuve implication intégrines
(Zisch, Schenk, Schense, Sakiyama-Elbert, & Hubbell, 2001) (Zisch et al., 2003)	End. & Vasc. Vasc.	Gels de fibrine Gels de PEG	h121 h121 h165	Covalent (étiquette + enzyme) Covalent via cystéine (ajoutée sur h121)	Radioactivité ELISA	Prolifération Migration Vasc.	 CAM ✓	Dose-dépendante gVEGF > sVEGF Clivage enzymatique des gels et de VEGF gVEGF < sVEGF
(Taguchi, Kishida, Akashi, & Maruyama, 2000)	End.	Films PE	h165	Covalent (EDC/NHS)	N.D.	Migration Prolifération		Synergie avec Fn

2.3.3.3 Synergie adhésion/prolifération

Il est généralement admis que VEGF est au cœur des processus de prolifération et migration des EC, cependant les avis divergent quant à son rôle sur l'adhésion. Certains n'observent pas d'amélioration de l'adhésion cellulaire en présence de VEGF (Crombez et al., 2005; Ito, 2008) ; contrairement à d'autres (Kawahara & Matsuda, 2012). Certains groupes attribuent l'adhésion observée à une interaction entre VEGF et certaines intégrines (Byzova et al., 2000; Hutchings et al., 2003; Traub et al., 2013). Quoi qu'il en soit, l'adhésion et la prolifération étant toutes deux nécessaires, la co-immobilisation de différents facteurs a ainsi été parfois étudiée (Tableau 2-5). Sans étudier la co-immobilisation en tant que telle, quelques études sur des gels de PEG exploitent également l'effet combiné de RGD et VEGF pour la vascularisation de néotissus *in vitro* (Leslie-Barbick et al., 2009; Porter et al., 2011a) et *in vivo* (Phelps et al., 2013; Zisch et al., 2003).

Tableau 2-5 : Synergie entre facteurs d'adhésion et de prolifération immobilisés.

Référence	Substrat	Protéines/ peptides greffés	Test où effet synergique
(Traub et al., 2013)	Plaques à puits	Chimère Fibronectine-VEGF	Adhésion et étalement
(Lee et al., 2012)	PLCL	RGD et bFGF	Adhésion, prolifération, phénotype
(Liu et al., 2007)	Revêtement d'or	VEGF et fibronectine	Migration (si gradient des deux protéines)
(Hatakeyama, Kikuchi, Yamato, & Okano, 2006)	CIPAAM	RGD et insuline	Adhésion et prolifération
(Taguchi et al., 2000)	PAA-g-PE	VEGF et fibronectine	Prolifération et migration

Le fait de présenter à la fois des facteurs d'adhésion de l'ECM et des facteurs de croissance imite encore une fois l'environnement cellulaire *in vivo* (Figure 2-5). Un effet synergique est ainsi observé lors de l'immobilisation de peptides/protéines d'adhésion de l'ECM et de facteurs de croissance (Tableau 2-5). L'explication associée est que la prolifération cellulaire induite par les facteurs de croissance est largement favorisée et accélérée par les propriétés adhésives dont est pourvue la matrice. L'organisation de la membrane cellulaire au niveau des points focaux d'adhésion pourrait expliquer cette synergie, du fait de la co-agglomération des intégrines et des récepteurs (Eliceiri, 2001; Le Saux et al., 2011). Certains affirment même que l'activation de certaines intégrines par l'ECM est nécessaire pour une action optimale des facteurs de croissance,

et réciproquement (Eliceiri, 2001). Une communication entre VEGF et $\alpha_v\beta_3$ a ainsi été mise en évidence (Byzova et al., 2000; Traub et al., 2013). Ces interactions peuvent prendre place à différents niveaux : entre le facteur de croissance et l'intégrine, entre le récepteur et l'intégrine, ou encore du fait des voies de signalisation communes à l'un et l'autre (Ross, 2004; Somanath, Ciocea, & Byzova, 2009). Notons que l'intégrine $\alpha_4\beta_1$, impliquée dans l'interaction avec le peptide REDV, n'a pas été étudiée dans ce contexte à notre connaissance mais une communication entre VEGF et β_1 a été identifiée (Byzova et al., 2000; T. T. Chen et al., 2010).

Quoique relativement peu étudiée, la co-immobilisation de VEGF et de peptides d'adhésion (e.g. REDV) apparaît donc une stratégie intéressante pour l'accélération de la ré-endothélialisation en profitant de cette synergie.

2.4 Cellules musculaires lisses : amies ou ennemies ?

2.4.1 Empêcher l'hyperplasie néointimale

Dans le but d'améliorer le devenir des prothèses vasculaires, une famille de stratégies vise à réduire l'hyperplasie néointimale, en réduisant la prolifération des cellules musculaires lisses (van Lith & Ameer, 2011). L'ajout d'agents thérapeutiques tels que le sirolimus et le paclitaxel sur les endoprothèses (*drug eluting stents* ou DES) en est un exemple (Curcio, Torella, & Indolfi, 2011). Toutefois, ces agents anti-prolifératifs affectent aussi négativement l'endothélialisation (Curcio et al., 2011).

De plus, l'hyperplasie néointimale semble plutôt une conséquence d'une compliance inadéquate des prothèses, comme présenté en introduction (*cf.* partie 1.3.2), et est majoritairement régulée par les cellules endothéliales (*cf.* partie suivante). Favoriser la formation d'un endothélium sain est donc prioritaire.

“A confluent and quiescent EC monolayer is likely to inhibit SMC proliferation and promote a contractile SMC phenotype and is thus needed for long-term inhibition of myointimal hyperplasia.” (Chan-Park et al., 2009).

2.4.2 Interactions media-intima

Composante principale de la couche médiane (media) des artères, les SMC sont physiquement proches des EC de l'intima. Il a été récemment observé que dans le processus d'angiogenèse, les SMC régulaient la prolifération des EC, et réciproquement, menant à la formation d'un tissu endothélial fonctionnel et stable (Wang et al., 2012; Yang & Proweller, 2011).

Sans décrire les voies mises en jeu, Fillinger et collègues (Fillinger, Sampson, Cronenwett, Powell, & Wagner, 1997) distinguaient déjà certains effets s'opérant à distance entre les EC et SMC (dans un milieu commun) tandis que d'autres nécessitaient le contact entre les deux cellules. La communication entre les cellules s'établit en effet pour partie par le biais de cytokines, produites par l'une et détectées par l'autre, comme c'est le cas pour NO ou TGF- β . Une proximité est cependant indispensable lorsque les ligands membranaires d'une cellule interagissent avec les récepteurs membranaires d'une cellule de l'autre type (*e.g.* voie Notch (Herbert & Stainier, 2011; Liu, Kennard, & Lilly, 2009; Yang & Proweller, 2011)). Une communication complexe s'établirait entre les deux types cellulaires, notamment en présence de VEGF (*cf.* partie 2.3.3.2), dépendamment de leur état. Par exemple, les SMC au phénotype contractile (non prolifératif) vont induire une certaine protection vasculaire aux EC (Wallace & Truskey, 2010). En revanche, les SMC au phénotype prolifératif vont au contraire augmenter la réponse inflammatoire des cellules endothéliales (Chiu et al., 2003). D'autres échanges s'établissent également lorsque les cellules endothéliales sont soumises au cisaillement (Hergenreider et al., 2012) ou quand la couche endothéliale est lésée (Balcels et al., 2010; Jacot & Wong, 2008). Le premier cas influe sur le phénotype des SMC ; tandis que le second est probablement un des déclencheurs de l'hyperplasie.

2.4.3 Revêtement abluminal

Un recouvrement abluminal de prothèses vasculaires avec des SMC permettrait ainsi d'imiter un peu plus l'environnement naturel des cellules endothéliales et de favoriser l'obtention du tissu endothélial recherché (Chan-Park et al., 2009). Notons néanmoins que la présence de SMC n'est pas nécessaire à la formation d'un endothélium fonctionnel, contrairement à ce qui a été cru pendant longtemps (van Lith & Ameer, 2011). Néanmoins, les propriétés mécaniques de la prothèse peuvent sans aucun doute être renforcées par la formation d'un analogue de la couche médiane (*cf.* partie 1.2), à condition que les SMC soient orientées circonférentiellement sur la

prothèse (Chan-Park et al., 2009; Sorrentino & Haller, 2011). Ainsi, une stratégie de double recouvrement apparaît pertinente et est envisagée par quelques groupes (Mohebbi-Kalhari, Rukhlova, Ajji, Bureau, & Moreno, 2012; Neff et al., 2011; Zhang et al., 2013).

Notons que dans le cadre de ce projet, la biofonctionnalisation se limitera au côté luminal et ne concernera par conséquent que les cellules endothéliales.

2.5 Biofonctionnalisation

“Currently, optimizing the interactions that occur at the surface of implanted biomaterials represents the most significant challenge to further advancement of graft technology. An increasing understanding of complex biological materials in the development of novel biomaterials custom-designed at the molecular level is therefore necessary.” (van Lith & Ameer, 2011)

Pour favoriser l’endothélialisation, les structures d’implants vont donc être munies de biomolécules de choix, généralement issues de deux classes principales : les peptides dits adhésifs (*e.g.* RGD ou REDV) et/ou les facteurs de croissance (*e.g.* VEGF). Le greffage de ces molécules sur un substrat implique plusieurs composantes, associées à différents critères de sélection, qui seront décrits dans cette partie et dont les idées sont résumées sur la Figure 2-8.

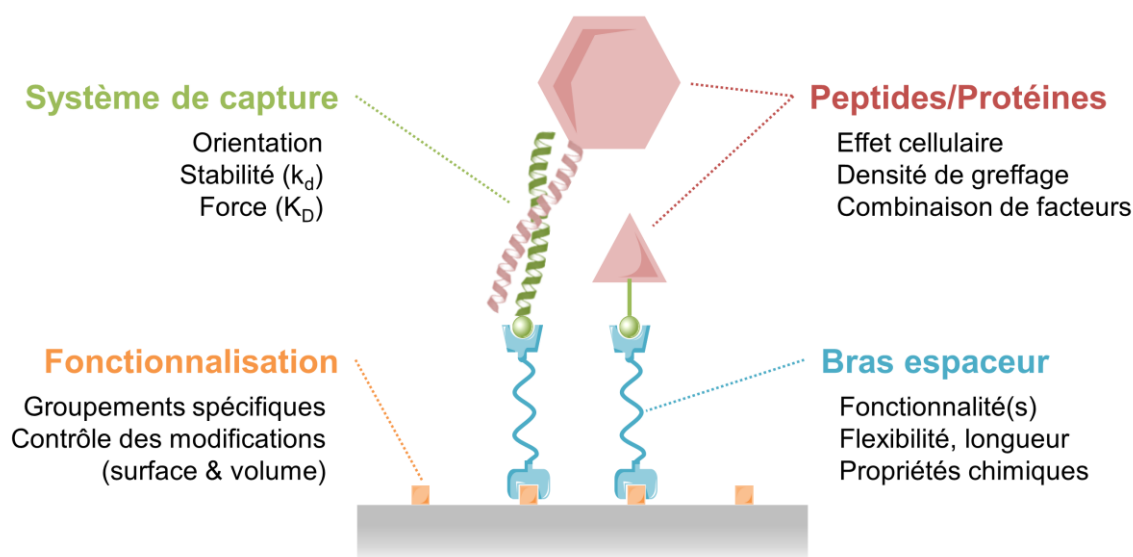


Figure 2-8 : Stratégie générale de greffage de biomolécules.

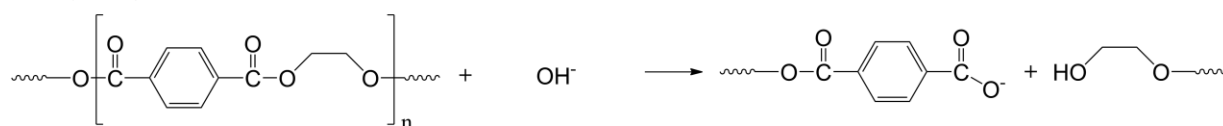
2.5.1 Fonctionnalisation : création de groupes d'ancrage

Pour munir notre matériau des fonctions adhésives de l'ECM ou de protéines aidant à la prolifération de cellules endothéliales, il est nécessaire d'avoir des groupements réactifs disponibles en surface de celui-ci (Ma, Mao, & Gao, 2007). Pour de nombreux polymères biocompatibles, y compris les polyesters, ces groupements ne sont pas présents à l'état naturel et doivent être créés (Muthuvijayan et al., 2009). Les fonctionnalités les plus couramment utilisées sont les amines, les carboxyles et également les hydroxyles, puisqu'ils permettent la conjugaison de diverses molécules (Siow, Britcher, Kumar, & Griesser, 2006).

2.5.1.1 Méthodes existantes

Voie chimique Dans le cas de polyesters, différentes réactions chimiques peuvent être exploitées pour fonctionnaliser ces polymères, notamment l'hydrolyse et l'aminolyse. L'hydrolyse (Figure 2-9-A) peut se faire aisément en milieu basique, par réaction entre les ions hydroxydes du milieu aqueux et les fonctions ester du polymère. Ce traitement permet l'introduction de groupements carboxyliques (Chen & McCarthy, 1998; Liu, He, & Gao, 2005; Marchand-Brynaert et al., 1995). L'aminolyse (Figure 2-9-B) implique la réaction avec un composé aminé, généralement un diamine tel que l'éthylènediamine (Bech, Meylheuc, Lepoittevin, & Roger, 2007; Bui, Thompson, McKeown, Romaschin, & Kalman, 1993; Irena, Jolanta, & Karolina, 2009; Nissen, Stuart, Stevens, & Baker, 2008). Les groupements de ce dernier réagissent avec les esters pour former un lien covalent amide. Seuls les groupements amines n'ayant pas réagi sont alors disponibles en surface du PET. Dans le cas d'un diamine, une des deux amines reste généralement exposée tandis que la seconde se retrouve impliquée dans le greffage covalent.

A. Hydrolyse du PET



B. Aminolyse du PET

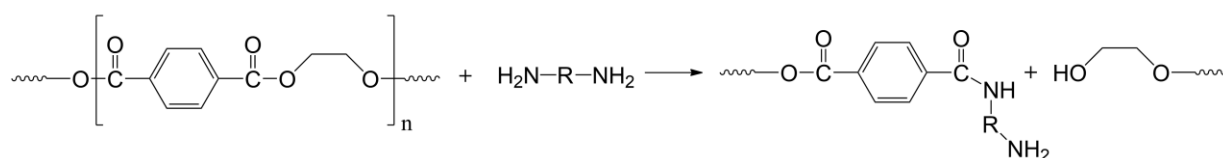


Figure 2-9 : Modifications chimiques du PET.

Traitement plasma La fonctionalisation de surface par plasma est largement répandue, et se base sur la formation de molécules réactives au sein d'un plasma. Le principe général est de soumettre un gaz, tel que N_2 , NH_3 et/ou O_2 , à un champ électrique élevé issu de radio fréquences ou micro-ondes. Le plasma ainsi formé contient des ions et des radicaux capables de réagir avec la surface de différentes manières. En fonction des conditions de formation du plasma (pression, voltage, durée d'exposition, *etc.*) et des substrats utilisés, la modification de la surface va se faire majoritairement par dépôt, substitution ou pulvérisation (Schröder et al., 2001; Siow et al., 2006). Les gaz contenant de l'azote peuvent ainsi créer des fonctions amines, tandis que les gaz composés d'oxygène et de carbone amèneront des carboxyles et hydroxyles.

Polymérisation de surface À défaut d'amener directement des groupements réactifs à la surface du matériau, divers procédés décrivent le greffage d'un autre polymère possédant ces fonctionnalités (Desmet et al., 2009; Siow et al., 2006). Un ensemble de techniques, dénommées « *grafting from* », permettent la polymérisation de monomères choisis, en phase liquide ou gazeuse, sur un substrat préalablement traité. Ce pré-traitement vise généralement à former des radicaux initiant la polymérisation, grâce à un traitement plasma (Ar, He) ou une irradiation (UV, X, γ). Dans le cadre des techniques dites « *grafting to* », ce pré-traitement n'est pas nécessaire et un plasma composé du monomère en phase gazeuse est directement appliqué au substrat. Des polymères aminés (*e.g.* polyacrylamide, polyallylamine ou PAAm) ainsi que carboxylés (*e.g.* acide polyacrylique) sont couramment polymérisés en surface par l'un ou l'autre de ces procédés (Desmet et al., 2009; Siow et al., 2006).

2.5.1.2 Limites et défis à relever

Les méthodes chimiques présentent de nombreux avantages en termes de contrôle et prédictabilité des mécanismes impliqués et permettent la modification homogène de structures complexes en 3D (Zhu, Mao, & Gao, 2013). De plus, elles sont simples à mettre en œuvre et ne nécessitent pas d'équipement particulier. Cependant, ces réactions impliquent le clivage des liens esters du polymère et induisent une dégradation plus ou moins importante en fonction de la diffusion des réactifs dans le matériau (Avny & Rebenfeld, 1986; Bech et al., 2007; Ellison, Fisher, Alger, & Zeronian, 1982; Fukatsu, 1992; Irena et al., 2009; Liu et al., 2005; Marchand-Brynaert et al., 1995). Cette limite devient d'autant plus importante dans le cadre d'applications où le rapport

surface/volume du substrat est grand (fibres) et où les propriétés mécaniques sont primordiales (Zhu et al., 2013).

Les méthodes physiques, basées sur l'irradiation ou le plasma, offrent une alternative intéressante à la voie chimique puisque les modifications apportées sont limitées à la surface du polymère. Cependant, elles présentent de nombreux inconvénients :

- La complexité des traitements et réglages associés rendent difficiles le contrôle et la compréhension des modifications apportées en surface (sélection du groupement souhaité, variétés des groupements, *etc.*) (Schröder et al., 2001) ;
- L'homogénéité chimique et topologique de la surface est parfois discutable, notamment du fait du bombardement ionique (Delaittre et al., 2012) ;
- De par leur voie d'introduction, les groupements réactifs s'avèrent généralement peu stables dans le temps (oxydation et reptation) (Siow et al., 2006) ;
- La pénétration dans les substrats poreux « 3D » est relativement limitée (Goddard & Hotchkiss, 2007).

Ainsi, aucun procédé existant ne permet a priori la fonctionnalisation de structures de PET poreuses de manière efficace et contrôlable sans dégrader le matériau dans son volume. Malgré l'efficacité reconnue de la plupart des méthodes présentées, il est généralement admis que des solutions alternatives sont nécessaires dans le cas de structures et applications complexes (Siow et al., 2006; Zhu et al., 2013).

2.5.2 Immobilisation de protéines

2.5.2.1 Immobilisation vs libération

2.5.2.1.1 Généralités

Les stratégies de biofonctionnalisation se différencient par la façon dont les protéines, quel que soit leur type, sont immobilisées : il peut s'agir d'une simple adsorption physique, d'un greffage chimique covalent ou non, orienté ou non (Jiao & Cui, 2007; Joddar & Ito, 2011). De nombreuses études ont montré qu'une immobilisation covalente était souhaitée, en particulier pour des dispositifs implantés à long terme. Tout d'abord, une interaction forte est en effet nécessaire pour

conserver un effet local et éviter le relargage de protéines ou autre matériel greffé dans la circulation. Ensuite, de par leur proximité forcée, les protéines greffées en surface sont impliquées dans la formation de complexes protéines-récepteurs multivalents, induisant un signal plus important que pour des protéines libres en solution (Figure 2-10-A). Enfin, l'immobilisation permet de préserver la bioactivité du dispositif à long terme en empêchant la protéine d'être métabolisée (Figure 2-10-B). Ces différents aspects sont détaillés dans plusieurs revues (Ito, 2008; Joddar & Ito, 2011; Masters, 2011).

Un bémol est néanmoins à apporter ici : bien que l'immobilisation ait montré ses avantages dans de nombreuses études pour les raisons sus-citées, les conséquences du fait d'empêcher l'internalisation du ligand restent controversées. Notons que cette internalisation n'a pas nécessairement lieu *in vivo*, notamment dans le cas d'une protéine liée à l'ECM (matricrine) ou à une autre cellule (juxtacrine) (Joddar & Ito, 2011).

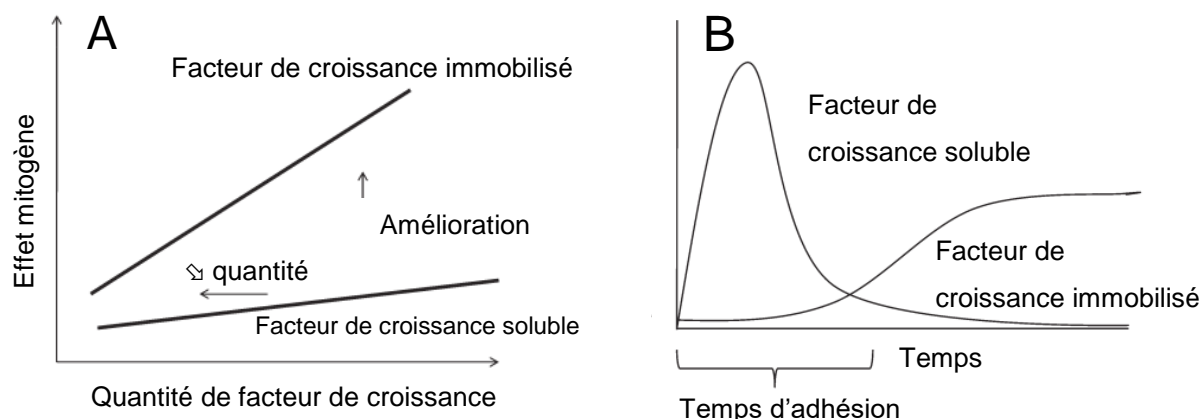


Figure 2-10 : Intérêts de l'immobilisation de facteurs de croissance (Ito, 2008).

2.5.2.1.2 Cas de VEGF

Pour exploiter le rôle mitogène de VEGF, différentes stratégies ont été envisagées : présence dans le milieu de culture *in vitro* (soluble), greffage covalent à un substrat, ou encore relargage contrôlé (Tableau 2-4). Certains observent une stimulation plus importante de la prolifération quand VEGF est immobilisé de manière covalente plutôt que soluble (Shen et al., 2008; Zisch et al., 2001). Cependant, d'autres groupes observent l'effet inverse (Anderson et al., 2009; Sharon & Puleo, 2008) et optent pour une stratégie d'immobilisation moins stable permettant l'éventuelle internalisation de la protéine (Crombez et al., 2005). Sachant que la plupart des isoformes de VEGF

(dont VEGF₁₆₅) peuvent être clivés par la plasmine (Ferrara et al., 2003) ou par des metalloprotéinases (T. T. Chen et al., 2010), il est bon de noter que VEGF a pu être malgré tout libéré lors de certains tests, même pour des stratégies d'immobilisation covalente. De plus, la dégradation du substrat et/ou l'adsorption non spécifique de VEGF peuvent mener à une libération non contrôlée des protéines.

L'isoforme VEGF₁₆₅ a la particularité d'être en équilibre *in vivo* entre une fraction soluble et une fraction liée à l'héparine. Cette dernière pourrait ne servir que de stockage temporaire, participant ainsi à un équilibre dynamique régulé par l'internalisation de VEGF par les cellules (Ferrara, 2010; Martino et al., 2015). Segura *et al.* ont commencé à étudier l'effet de la présentation de VEGF et de son éventuelle internalisation sur l'effet cellulaire induit (Anderson et al., 2011; T. T. Chen et al., 2010). Il en ressort que VEGF₁₆₅ peut non seulement activer VEGFR-2 lorsqu'il est immobilisé (et non clivé) mais aussi prolonger son activation. Ainsi, bien que l'internalisation de VEGFR-2 soit nécessaire, celle de VEGF ne serait pas indispensable à son action.

2.5.2.2 Immobilisation et orientation

2.5.2.2.1 Généralités

L'immobilisation de protéines peut se faire directement grâce à un groupement fonctionnel de la dite protéine, par exemple au moyen de la chimie par EDC formant un lien amide entre COOH et NH₂ (*cf.* exemples du Tableau 2-4). Cependant, ces groupements sont généralement multiples (N-terminal + lysines pour NH₂ ou C-terminal + glutamates + aspartates pour COOH) et peuvent être en partie présents au sein des sites actifs de la protéine. Ces techniques peuvent donc altérer la bioactivité de la protéine de par une mauvaise orientation sur la surface et/ou une dénaturation (Delaittre et al., 2012; Joddar & Ito, 2011; Sharon & Puleo, 2008). Le recours à l'ingénierie génétique pour produire des protéines recombinantes avec une séquence spécifique destinée à l'immobilisation permet d'obtenir une orientation contrôlée et donc une meilleure réponse biologique du fait de l'exposition des sites actifs (Joddar & Ito, 2011). Parmi les modifications utilisées, on retrouve l'ajout d'une biotine (se liant fortement à la streptavidine, $K_D = 10^{-14}$ M), de domaines se liant au collagène, de partie Fc d'anticorps, des étiquettes peptidiques ou encore des sites de reconnaissance d'enzyme (Camarero, 2008; Ito, 2008; Joddar & Ito, 2011; Moss, Sharma, & Brindle, 2009).

2.5.2.2.2 Exemples avec VEGF

Comme l'illustre le Tableau 2-4, la plupart des études passent malgré tout par un greffage non spécifique via les amines (lysines) de VEGF au moyen de la chimie carbodiimide (EDC/NHS). Il a été néanmoins observé que lorsque VEGF était greffé dans ces conditions, sa bioactivité était moindre (Anderson et al., 2009; Hu et al., 2012) voire absente (Galas & Liu, 2014).

Quelques stratégies ont été mises en œuvre pour obtenir un greffage covalent de VEGF, moins susceptibles d'affecter sa conformation et donc sa bioactivité :

- L'étiquetage de VEGF avec une séquence spécifique à la transglutaminase du facteur XIIIa et greffage à la fibrine (Zisch et al., 2001). Cette stratégie manque cependant de polyvalence ;
- L'étiquetage de VEGF et conjugaison à la fibronectine (Fn) spécifique à l'étiquette via un espaceur bifonctionnel (Backer et al., 2006). Même si cette stratégie est utilisée pour l'adsorption de Fn-VEGF dans l'article, la stratégie décrite pourrait être appliquée au greffage sur substrat solide.
- L'oxydation de la chaîne glycosylée de VEGF pour faire apparaître des groupements aldéhydes servant par la suite au greffage (Sharon & Puleo, 2008). Cette stratégie élégante évite notamment le passage par l'ingénierie génétique.
- L'utilisation du peptide QK mimant le site de liaison aux VEGFR (D'Andrea et al., 2005) est une stratégie également explorée. Celle-ci permet de profiter des avantages des peptides (*cf.* partie 2.5.2.3), et de contourner les difficultés liées à l'immobilisation covalente de VEGF (Leslie-Barbick, Saik, Gould, Dickinson, & West, 2011). Bien que le peptide QK ait montré des effets agonistes à VEGF, son effet reste différent de la protéine complète (Leslie-Barbick et al., 2011). Des différences notables ont été observées entre le peptide QK soluble et immobilisé, pouvant aller jusqu'à un effet antagoniste du peptide immobilisé vis-à-vis de VEGF (Cai, Dinh, & Heilshorn, 2014; Koepsel, Nguyen, & Murphy, 2012). Certains aspects restent donc à élucider quant au rôle du peptide QK, également vis-à-vis de l'absence de dimérisation et de l'effet additif avec VEGF (Chan, Stahl, & Yu, 2011; D'Andrea et al., 2005).

2.5.2.2.3 Système de capture peptidique E5/K5

Un système d'accroche est utilisé au sein de notre groupe pour permettre une immobilisation orientée de biomolécules étiquetées d'une séquence peptidique spécifique (peptide E5) sur une surface recouverte de la séquence partenaire (peptide K5).

Ce système est inspiré d'une structure naturellement rencontrée dans des interactions protéine-protéine de tous les organismes, appelée super-hélice (ou *coiled-coil* en anglais). Les peptides E5 et K5, de conformation initialement aléatoire, adoptent une conformation d'hélice alpha lorsqu'ils sont mis en présence et s'enroulent l'un autour de l'autre. La formation de ce type d'hétérodimère super-hélice se fait sous l'action de différentes forces au sein d'une heptade (bloc de 7 résidus), lui donnant diverses caractéristiques (Figure 2-11) :

- Sa spécificité, de par les forces électrostatiques s'établissant entre les résidus en position e et g à pH physiologique ;
- Sa stabilité, de par le cœur hydrophobe formé par les résidus en position a et d, présent indépendamment du pH ;

La force de l'interaction (K_D) est ajustable en fonction de la séquence choisie et de son nombre de répétitions le long de la chaîne peptidique (De Crescenzo, Litowski, Hodges, & O'Connor-McCourt, 2003; Litowski & Hodges, 2001; Litowski & Hodges, 2002).

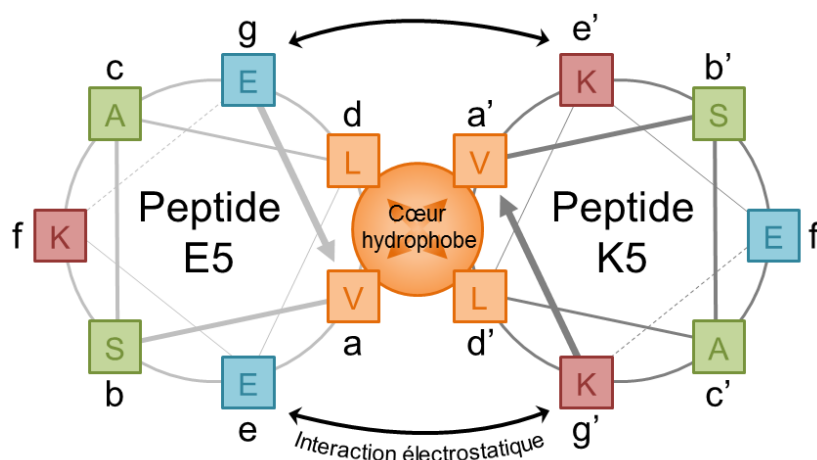


Figure 2-11 : Interaction super-hélice entre les peptides (EVSALEK)₅ et (KVSALKE)₅, ou E5 et K5, respectivement.

Les peptides E5 et K5 dont il est question ici font partie de la famille VSAL et comptent 5 heptades de répétition (Figure 2-11). Deux protéines étiquetées avec le peptide E5, à savoir EGF et VEGF, ont été produites au laboratoire et leur bioactivité a été démontrée, en solution tout comme immobilisées (Boucher et al., 2008; Murschel et al., 2013). L'interaction entre ces protéines étiquetées E5 et K5, bien que non covalente, est forte et stable ($K_D \approx 10^{-8}$ M ou moins). (Boucher, Liberelle, Jolicoeur, Durocher, & De Crescenzo, 2009; Murschel et al., 2013)

Dans le contexte de ce projet, VEGF sera immobilisé de manière stable et orienté au sein du revêtement développé grâce au système de capture E5/K5.

2.5.2.3 Cas des peptides

Les peptides d'adhésion (ainsi que le peptide K5) peuvent eux aussi être immobilisés de diverses manières. Leur séquence étant très courte, une synthèse chimique de ces peptides est possible et une étiquette peut aisément leur être ajoutée, contrairement aux protéines (Collier & Segura, 2011). Cette étiquette a pour but de fournir un groupement chimique unique au sein de la séquence permettant le greffage orienté et, dans notre cas, covalent. En effet, même si le problème de la multiplicité des amines et carboxyles persiste (*e.g.* D et E pour REDV et K et E pour le peptide K5), on peut en revanche utiliser les groupements atypiques de certaines chaînes latérales d'acides aminés tels que ceux de la tyrosine (Demolliens et al., 2008) et la cystéine (Boucher et al., 2009), à condition que ceux-ci soient initialement absents de la séquence peptidique d'intérêt (Delaittre et al., 2012).

Ainsi, ne présentant pas initialement de cystéine, la séquence Cys-Gly-Gly sera ajoutée en N-terminal des peptides d'adhésion sélectionnés ainsi que du peptide K5. Ce greffage par le groupement thiol a déjà été mis en œuvre efficacement (Boucher et al., 2010; McMillan, Meeks, Bensebaa, Deslandes, & Sheardown, 2001).

2.5.2.4 Rôle du bras espaceur

Diverses molécules synthétiques existent permettant de lier un groupement thiol à un autre groupement tel qu'une amine ou un carboxyle (Hermanson, 2013). Celles-ci seront utilisées pour le greffage covalent des peptides sur les surfaces de PET fonctionnalisées. Notons qu'en plus de créer un lien covalent stable entre le peptide et la surface, cette « molécule-lien » assure également un rôle de bras espaceur, amenant plus de flexibilité pour l'interaction peptide/cellule (ou peptide/protéine ou protéine/cellule) (Ito, 2008; Sharon & Puleo, 2008).

Le choix de l'espaceur, et de sa longueur, peut avoir un rôle critique sur la bioactivité de la protéine greffée (Sharon & Puleo, 2008). Quelques études traitant de l'influence de la longueur de l'espaceur montrent que la distance minimale requise pour l'interaction entre un peptide greffé et l'intégrine correspondante est de l'ordre de quelques nanomètres : 3.5 nm (Hersel, Dahmen, & Kessler, 2003; Kantele et al., 1999) ou 12 résidus glycines (Lee, Park, Lee, Lee, & Lee, 2010).

On peut également ajouter une fonction supplémentaire à cette molécule en choisissant un bras hydrophile PEG, connu pour diminuer l'adsorption non spécifique de protéines comme décrit à la partie 2.2.4.1 (Delaittre et al., 2012).

2.5.2.5 Densité de greffage

Shin et collègues ont fait une revue en 2003 des effets de la densité de greffage de peptides et protéines de l'ECM (Shin, Jo, & Mikos, 2003), et tirent les deux idées générales suivantes :

- La densité minimale requise pour l'adhésion cellulaire peut aller du fmol/cm² au pmol/cm² dépendamment des propriétés de la surface ;
- La densité maximale n'est généralement pas l'optimal, et un comportement bi-phasique peut être observé.

Plusieurs groupes rapportent un effet de la densité de RGD et VEGF greffés sur la réponse cellulaire en accord avec les observations de Shin (Tableau 2-6). Les densités optimales pour RGD varient en effet sur plusieurs ordres de grandeur (entre 1 fmol/cm² et plus de 100 pmol/cm²). En ce qui concerne VEGF, les densités greffées sont rarement caractérisées, et sont souvent similaires (20 à 200 ng/cm², Tableau 2-4). Pour RGD comme pour VEGF, un comportement bi-phasique est en effet quelque fois observé (Tableau 2-6).

Dans chaque cas particulier, l'interprétation des effets de densité reste complexe et il faut considérer divers paramètres, tels que la flexibilité du lien entre la protéine/peptide et la surface ainsi que l'encombrement stérique. Ce dernier implique généralement une saturation physique de la surface par les protéines trop nombreuses. De plus, à leur densité maximale, les protéines peuvent devenir inaccessibles pour les cellules, et donc diminuer la réponse cellulaire (Goddard & Hotchkiss, 2007). Cet effet de surcharge (*overcrowding*) peut même apparaître plus tôt dans les étapes de greffage, notamment pour l'interaction entre les peptides E5 et K5 (White et al., 2012). Même avant d'atteindre de telles conditions, il devient inutile de maximiser la densité de groupements/peptides d'attache si l'espacement entre ces derniers devient plus faible que la taille même de la protéine à greffer (Siow et al., 2006).

Au-delà de ces considérations d'encombrement stérique, dans le cas des facteurs de croissance, le phénomène d'oligomérisation des couples ligands/récepteurs, ainsi que la densité de récepteurs sur les cellules, vont intervenir dans la densité optimale de ligands immobilisés (Ichinose, Morimatsu, Yanagida, & Sako, 2006). Dans le cas des peptides d'adhésion, il existe des concepts similaires d'agglomération des intégrines pour la formation de points focaux d'adhésion sur lesquels la densité va influencer. De plus, dans le cadre d'une étude de co-immobilisation, une interaction de proximité peut s'opérer dépendamment des densités greffées, par la formation d'hétéro-agrégats lors des interactions ligand/récepteur respectives aux molécules greffées (*cf.* partie 2.3.3.3) (Shahal, Geiger, Dunlop, & Spatz, 2012).

Enfin, le comportement cellulaire peut devenir anormal en présence de trop forte quantité de certaines protéines telles que VEGF et pourra être considérée dans le cas de fortes densités (Ozawa et al., 2004; Place, George, Williams, & Stevens, 2009).

Notons également que la répartition spatiale des molécules greffées peut jouer un rôle et fait également l'objet d'études (Bacakova et al., 2011; Huang et al., 2009; Ventre, Causa, & Netti, 2012). Une telle étude ne sera pas menée ici et la répartition sera considérée *a priori* comme homogène.

Tableau 2-6 : Influence de la densité de peptides/protéines greffées.

	Référence	Substrat	Caract. densité	Gamme greffée (Gamme injectée)	Cellules	Test où effet observé	Tendance
Peptide RGD	(Lagunas et al., 2012)	Verre + PMMA	SPR	2.8 – 4.4 pmol/cm ²	NIH/3T3	Adhésion Étalement Points focaux	↗
	(Le Saux et al., 2011)	Silice	XPS	10 ⁻⁷ à 100 pmol/cm ²	BAEC	Adhésion Activation intégrines	↗ puis ↘ Max : 10 ⁻³ pmol/cm ²
	(Chollet et al., 2009)	PET	Colorimétrie COOH (TBO)	60 – 240 pmol/cm ²	HSVEC	Adhésion Points focaux	↗ puis ↘ (max : 170) ↗
	(Berg, Yang, Hammond, & Rubner, 2004)	LbL acide polyacrilique et polyacrylamide	Radioactivité	4 – 25 pmol/cm ²	Fibroblastes WT NR6	Adhésion Étalement	↗
	(Massia & Hubbell, 1991)	Verre	Supposé quantitatif + données non publiées	(10 ⁻⁶ – 1 pmol/cm ²)	HFF	Étalement	↗ puis = Seuil : 1 fmol/cm ²
Facteur de croissance VEGF	(Galas & Liu, 2014)	Plaques à puits	ELISA direct	0.04 à 18.6 ng/cm ²	HUVEC MSC	-	Pas d'effet de VEGF
	(Wu et al., 2014)	<i>Silicon wafer</i> + APTES	ELISA indirect	54 à 132 ng/cm ²	hEC	Migration	=
	(Traub et al., 2013)	Plaques à puits	ELISA direct	(12 à 781 nM)	HUVEC	Adhésion	↗ puis = Seuil : 49 nM
	(Shin et al., 2012)	Films de PLCL + dopamine	ELISA indirect et direct	20 et 200 ng/cm ²	HUVEC	Migration Prolifération	↗
	(Shen et al., 2008)	Gels de collagène	ELISA direct	40 et 110 ng/mL	H5V	Prolifération	=
	(Miyagi et al., 2011)		ELISA indirect	200 et 1300 ng/mL	H5V in vivo	Prolifération Angiogénèse	↗
	(Backer et al., 2006)	Plaques à puits	Clivage puis WB	0.056 à 5.6 pmol/cm ² = 2.5 à 250 ng/cm ²	293/KDR	Prolifération	↗ puis ↘ Max : 25 ng/cm ²
	(Ito et al., 2005)	Verre ou PS + gélatine	Supposé quantitatif	(0.32 à 15.9 ng/cm ²)	HUVEC	Prolifération	↗
	(Zisch et al., 2001)	Gels de fibrine	Radioactivité	(0.1 à 10 µg/mL)	HUVEC	Prolifération	↗ puis ↘ Max : 1 µg/mL

2.6 Méthodes de caractérisation

2.6.1 Propriétés mécaniques

Lors des modifications chimiques de nos structures, les propriétés mécaniques des prothèses peuvent être altérées et il est important de les caractériser à chaque étape. En particulier lors de la modification du PET pour lui amener des groupes d'ancrage : cette réaction ayant lieu directement avec le polymère de la structure, une dégradation des propriétés mécaniques peut être observée (*cf.* partie 2.5.1). Une caractérisation efficace et viable des propriétés-clé de compliance et pression d'éclatement est donc nécessaire.

La compliance se définit comme la capacité de la structure à se dilater ($\frac{D_{sys}-D_{dia}}{D_{dia}}$) suite aux changements de pression artérielle lors des battements cardiaques (entre la systole et la diastole : $P_{sys} - P_{dia}$).

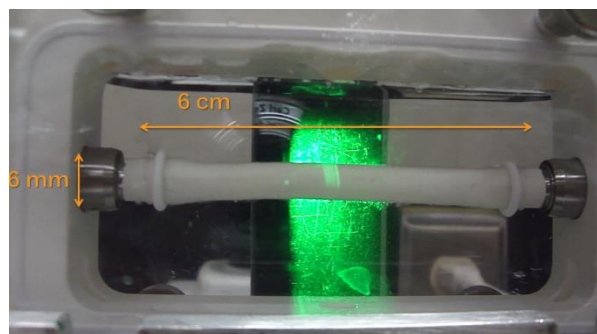
$$\text{Compliance (\% mmHg}^{-1}\text{)} = \frac{D_{sys} - D_{dia}}{D_{dia} (P_{sys} - P_{dia})} \times 100$$

Où D_{sys} et D_{dia} sont les diamètres du vaisseau lors de la systole et la diastole, respectivement, et P_{sys} et P_{dia} sont les pressions systolique et diastolique, respectivement.

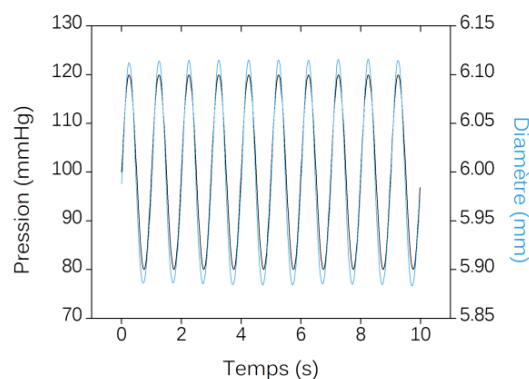
La caractérisation de cette propriété se fait par des techniques similaires à celle décrite par Moreno et collègues (Moreno et al., 2011; Schmedlen et al., 2006). Il s'agit de connecter la structure tubulaire à un montage permettant de faire circuler un liquide physiologique avec un contrôle de pression via une pompe (Figure 2-12). La mesure du diamètre de la structure se fait grâce à un laser. Les structures utilisées ont été conçues pour vérifier les propriétés attendues de compliance (*cf.* partie 2.1.1) (Moreno et al., 2011).

La caractérisation de la *pression d'éclatement* se fait avec un système similaire à celui pour la mesure de compliance. L'augmentation de pression peut se faire à différents débits, et avec un liquide (Konig et al., 2009) ou un gaz (Moreno et al., 2011), mais de légères différences ont été observées en fonction des conditions de mesures (Sarkar, Hillery, Seifalian, & Hamilton, 2006). On doit donc veiller à respecter un protocole fixe pour effectuer les comparaisons entre essais.

L'évolution du diamètre avec la pression est suivie jusqu'à éclatement de la structure, par un balayage laser (Figure 2-12 (a)).



(a) Montage de la structure sur le circuit
et mesure de diamètre par laser.



(b) Mesure du diamètre sous variations
de pression physiologique (80/120 mmHg, 1Hz).

Figure 2-12 : Mesures de compliance de prothèses vasculaires.

2.6.2 Fonctionnalisation et densités

Pour quantifier la densité de molécules greffées, il faut à la fois un test spécifique et quantitatif de ce que l'on veut caractériser. Diverses méthodes de caractérisation chimique existent (XPS, FTIR, SIMS, *etc.* (Ma et al., 2007)). Cependant, celles-ci sont souvent lourdes, coûteuses, imposent parfois un substrat spécifique et sont pour la plupart seulement semi-quantitatives. Des méthodes plus simples avec un accès direct à la quantité recherchée sont donc très avantageuses. Notons qu'il n'y a généralement pas de méthode standard, ce qui rend difficile la comparaison des densités entre études de par la diversité des méthodes employées et de leurs biais respectifs (Tableau 2-6).

Quantification des groupements réactifs : Différentes méthodes colorimétriques existent pour compter les groupements tels que les amines ou les carboxyles. Ces tests reposent sur l'interaction électrostatique d'une molécule colorée avec la charge de ces groupements à un pH donné (Orange II/ NH_3^+ et bleu de toluidine (TBO)/ COO^-) (Goddard & Hotchkiss, 2007; Ma et al., 2007; Tiraferri & Elimelech, 2012). Elles supposent la présence d'une unique espèce chargée (positivement ou négativement) au pH de travail.

Protéines – Tests indirects : Des tests performants existent pour quantifier les protéines en solution. Ils sont pour la plupart basés sur l'interaction spécifique entre un anticorps et la dite protéine (*e.g.* ELISA (Chiu & Radisic, 2010)) ou sur les interactions ioniques/hydrophobes entre

un colorant et la protéine (*e.g.* Bradford (Ichinose et al., 2006)). On peut ainsi envisager de quantifier les protéines restant dans le surnageant de réaction pour savoir combien ont été greffées. La faiblesse de telles mesures indirectes est qu'on ne peut pas distinguer adsorption non-spécifique et greffage, ce qui impose de multiples contrôles (Goddard & Hotchkiss, 2007; Masters, 2011).

Protéines – Tests directs : La quantification directe de protéines sur la surface est aussi envisageable. Un des avantages est de permettre le rinçage d'une partie des protéines adsorbées non spécifiquement aux surfaces avant leur quantification. En théorie, des tests ELISA adaptés permettent cette mesure directe (Anderson et al., 2009; Crombez et al., 2005; Shen et al., 2008). Initialement dédié à la quantification de protéines en solution, un test ELISA classique repose sur l'interaction d'un antigène (protéine) avec une surface (puits) recouverte d'anticorps. Les différentes interactions qui s'en suivent ont effectivement lieu avec la surface présentant les protéines. Il apparaît alors assez naturel de transférer ce test à des surfaces fonctionnalisées avec cette protéine. En pratique, la calibration du signal d'absorbance recueilli est moins aisée puisqu'il faudrait disposer de surfaces avec une densité connue de protéines. D'autre part, la densité maximale détectée est relativement faible (Shen et al., 2008). Enfin, l'application de la méthode à différents substrats reste à démontrer puisqu'une densité de protéines donnée pourrait ne pas fournir le même signal en fonction de la technique d'immobilisation (orientée ou non, encombrement stérique, *etc.*).

Du fait de ces défauts, l'étiquetage radioactif est une technique alternative directe efficace quelquefois employée (Ma et al., 2007; Zisch et al., 2001). Le principe est de conjuguer la protéine à un isotope radioactif tel que l'iode ^{125}I avant greffage sur la surface et de mesurer ensuite l'émission radioactive de la surface biofonctionnalisée. On doit alors supposer alors que la protéine sans étiquette se greffera à la même densité pour des conditions données.

Une dernière possibilité est de quantifier les protéines greffées en déterminant la masse déposée à la surface suite à la réaction de greffage, ce qui est rendu possible par les microbalances à quartz (QCM-D) (Ma et al., 2007).

2.6.3 Bioactivité (*in vitro*)

2.6.3.1 Culture cellulaire sur substrats biofonctionnalisés

Les cellules généralement utilisées pour ce type d'étude sont les cellules endothéliales humaines issues de cordons ombilicaux ou HUVEC (Nachman, 2012). Cette lignée est majoritairement utilisée pour les études *in vitro* de par leur disponibilité et facilité d'extraction, contrairement aux cellules endothéliales progénitrices (EPC) (Kawahara & Matsuda, 2012). Il faut cependant avoir à l'esprit qu'elles peuvent présenter de légères différences avec d'autres lignées cellulaires (Porter et al., 2011a, 2011b), en particulier avec les EPC (Bompais et al., 2004; Liu et al., 2014). En particulier, les HUVEC prolifèrent moins que les autres cellules endothéliales et deviennent rapidement sénescents (Bompais et al., 2004), ce qui peut être amélioré par l'utilisation d'un milieu de culture défini approprié (*e.g.* EGM-2) (Bala, Ambwani, & Gohil, 2011).

L'évaluation de la réponse cellulaire sur le substrat biofonctionnalisé se fait généralement dans un milieu de formulation modifiée. Par exemple, pour un test d'adhésion, un milieu sans sérum est généralement utilisé, évitant ainsi le biais apporté par les protéines adsorbées (Zhu et al., 2001). Cependant, bien que ces conditions soient pertinentes à la détermination de la bioactivité des molécules greffées, elles ne sont pas représentatives des conditions réelles, où les protéines du sérum vont effectivement s'adsorber sur l'implant et possiblement masquer l'effet de la biomolécule greffée. Si le revêtement adsorbe peu de protéines (*e.g.* PEG), il peut être ainsi préférable de procéder à un test d'adhésion en milieu complet, et de rincer par la suite les protéines adsorbées et cellules faiblement adhérentes (Zhu et al., 2001).

Des questions similaires se posent pour les essais de prolifération. L'utilisation de milieux définis tels que le milieu EGM-2 permettent de retirer les facteurs de croissance solubles du milieu, ce qui est fait dans la plupart des études. Une autre procédure rarement employée est également bénéfique pour les tests de prolifération : le sevrage des cellules. Ce dernier se fait dans un milieu avec une faible quantité de sérum (< 1%) et permet à la fois de synchroniser le cycle cellulaire et de se débarrasser de la majorité des protéines endogènes. D'autre part, en présence d'une faible quantité de sérum, les HUVEC se retrouvent à l'état quiescent, nous rapprochant ainsi un peu plus des conditions réelles (Staton, Reed, & Brown, 2009). La densité de départ des cellules est aussi importante pour les tests de prolifération, et est généralement choisie autour de 10 000 cellules/cm²

(Hu et al., 2012; Porter et al., 2011a; Shin et al., 2012). Si plusieurs revêtements sont comparés, il est également important de dissocier les effets d'adhésion et de prolifération.

2.6.3.2 Quantité de cellules

Pour évaluer la colonisation cellulaire de notre matériau, nous aurons à évaluer l'adhésion et la prolifération des cellules endothélialesensemencées. Ces évaluations peuvent se faire au moyen d'un simple compte cellulaire à un temps donné. Dans la littérature, on trouve plusieurs familles de tests permettant le compte cellulaire :

Essais basés sur la coloration d'acides nucléiques : La coloration est permise par de nombreuses molécules (e.g. CyQuant® (Moreno et al., 2011), Sytox® (Murschel et al., 2013)). Ces tests sont généralement associés à une lyse cellulaire, ou une fragilisation de membrane avec des agents comme le Triton X-100 ou le Tween 20, pour que la molécule puisse pénétrer dans les cellules et atteindre le noyau. Dans le cas contraire, ces tests permettent de compter les cellules mortes, dont la membrane fragilisée est perméable à ces composés. Il existe d'autres molécules comme DAPI (Yang & Proweller, 2011) ou Hœchst (Lee et al., 2012) qui peuvent traverser la membrane cellulaire, que celles-ci soient vivantes ou non. Également utile pour évaluer la prolifération, l'ajout d'une base azotée étiquetée (BrdU, (Dorafshar et al., 2003; Jacot & Wong, 2008; Shin et al., 2012) ³H-thymidine (Li et al., 2009; Ma et al., 2007)), qui va être incorporée dans l'ADN au moment de sa réplication, permet de quantifier les cellules prolifératrices.

Essais mesurant l'activité métabolique des cellules : Le composé principal de ces tests est transformé par les enzymes produites dans les cellules vivantes et forment un produit absorbant ou fluorescent.

- Par spectrométrie : MTT (Lin et al., 2012; Wei et al., 2011), XTT (Shen et al., 2008), WST (Murschel et al., 2013), MTS (Phelps et al., 2013). Le produit de ces réactions se retrouve, naturellement ou non, dans le milieu extracellulaire à la fin du test. L'activité métabolique est alors mesurée par absorbance ou fluorescence. Cette mesure est généralement considérée comme proportionnelle à la quantité de cellules vivantes, mais une calibration est nécessaire pour trouver la corrélation entre les deux (si besoin). Le test basé sur la résazurine (Alamar Blue® et Vybrant®) suit un principe similaire, à ceci près qu'il est basé sur le pouvoir réducteur des cellules vivantes plutôt que sur une activité enzymatique. (Moreno et al., 2011; Seifalian, Salacinski, Punshon, Krijgsman, & Hamilton, 2001).

- Par imagerie : CFDA-AM (Chiu & Radisic, 2010; Moreno et al., 2011), Calcéine-AM (Ceylan et al., 2011; Plouffe et al., 2007), fluorescéine de diacétate (Lin et al., 2012; Wei et al., 2011). Le réactif de ces réactions traverse la membrane cellulaire mais pas le produit fluorescent issu de la réaction enzymatique. La fluorescence reste ainsi localisée à l'intérieur des cellules vivantes, et permet le compte direct des cellules colorées sans calibration (Ma et al., 2007).

Que ce soit pour la prolifération ou l'adhésion, il n'y a donc pas de méthode étalon pour le compte cellulaire. Pour être aussi rigoureux que possible, il est généralement recommandé de procéder à plusieurs tests pour déterminer le nombre de cellules (Staton et al., 2009) :

- Un compte direct des cellules viables (*e.g.* CFDA-AM) ou prolifératives dans le cas d'un test de prolifération (*e.g.* BrdU) ;
- Un compte direct des cellules mortes (*e.g.* iodure de propidium) ;
- Une mesure de l'activité métabolique (*e.g.* résazurine).

2.6.3.3 Phénotype cellulaire

Plus complexe qu'un simple compte cellulaire, le phénotype cellulaire peut être corrélé à différents paramètres. Dans un premier temps, la distribution des cellules peut être observée, par exemple grâce aux tests permettant d'imager les cellules viables (*cf.* partie 2.6.3.1).

Ensuite, on a généralement recours à l'immunofluorescence pour détecter la présence de certains composants clés du phénotype. Le principe est basé sur l'interaction antigène/anticorps, l'antigène étant le composant en question. La détection est généralement faite en deux étapes : un premier anticorps s'attache à l'antigène, puis un second anticorps étiqueté d'un colorant détecte le complexe antigène/anticorps (Ma et al., 2007).

On associe généralement différents tests pour colorer le noyau cellulaire ainsi que les composants liés à la morphologie cellulaire et à l'ECM (*e.g.* actine) (Moreno et al., 2011). D'autres colorations plus spécifiques sont aussi menées, pour analyser les images en termes de points focaux d'adhésion (vinculine, paxilline, FAK) (Bacakova et al., 2011; Chollet et al., 2009) de jonctions entre les cellules endothéliales commençant à former un tissu (CD31) (Chiu & Radisic, 2010; Hu et al., 2012; Lee et al., 2012), *etc.* Il peut aussi être intéressant d'évaluer l'expression de facteur de von

Willebrand (vWF), spécifique aux cellules endothéliales (Chiu & Radisic, 2010; Hu et al., 2012; Nachman, 2012).

2.6.3.4 Autres tests

Production de NO : L'oxyde nitrique étant impliquée à la fois dans la thrombose et l'hyperplasie (cf. partie 2.2.3.2), c'est un facteur important de la signalisation des cellules endothéliales et sa production est parfois quantifiée (Wei et al., 2013; Z. Yang et al., 2012; Z. L. Yang et al., 2012). La production de NO est notamment régulée par la présence de VEGF (Figure 2-7). La caractérisation de la quantité de NO sécrétée par les EC dans le milieu de culture s'effectue en quantifiant les nitrites et les nitrates, produits de la dégradation de NO (Miranda, Espey, & Wink, 2001). Les nitrites sont quantifiés directement grâce au réactif de Griess, tandis que les nitrates doivent d'abord être convertis en nitrites sous l'action d'une enzyme ou d'un agent chimique (Miranda et al., 2001).

Voies de signalisation et production de cytokines : Pour aller plus loin dans l'interprétation des résultats cellulaires obtenus, on peut étudier les voies de signalisation impliquées (Figure 2-7). Un contrôle de l'activation de certaines voies peut être réalisé en bloquant un récepteur visé, que ce soit par l'ajout d'un analogue du ligand immobilisé en solution ou d'antagonistes spécifiques (*e.g.* anticorps anti-VEGFR-2) (Byzova et al., 2000). Pour détecter la production de certaines protéines par les cellules (*e.g.* PGI₂), on peut aussi avoir recours aux tests ELISA ou aux immuno-buvardages de type Western.

Migration cellulaire : La migration des cellules endothéliales est également étudiée, considérant qu'une endothélialisation trans-anastomotique peut s'opérer *in vivo* et contribuer à l'accélération du recouvrement cellulaire. La migration peut être évaluée en ajoutant un masque d'une zone surfacique lors de l'adhésion cellulaire, qui sera retiré une fois la confluence obtenue sur le reste de la surface (Lee et al., 2012). On peut alors imager la surface dans le temps et traiter les images pour obtenir la vitesse de migration.

Influence du cisaillement : La force de cisaillement correspond à la force de tension de l'afflux sanguin agissant sur la paroi d'un vaisseau et qui augmente lors de la division de ceux-ci en deux embranchements ou plus (Grand Dictionnaire Terminologique).

Il est intéressant d'étudier l'influence du cisaillement selon deux points de vue. Le premier est de vérifier que les propriétés adhésives de la matrice utilisée suffisent pour retenir les cellules endothéliales sous l'effet du cisaillement (Kawahara & Matsuda, 2012). Le second est d'étudier la mécano-transduction de signaux dans les cellules (Chatzizisis et al., 2007; Li, Haga, & Chien, 2005). Plusieurs études discutent du rôle athéroprotecteur du cisaillement et de son implication dans l'athérosclérose (Chatzizisis et al., 2007; Hergenreider et al., 2012). D'autre part, des études montrent qu'un pré-conditionnement au cisaillement des prothèses ensemencées aide à la rétention des cellules endothéliales (Baguneid et al., 2004).

Les conditions physiologiques du cisaillement sont très variables au sein du système sanguin. Elles vont dépendre notamment de la taille et la géométrie du conduit (embranchement). Pour les artères de large diamètre, il dépasse rarement 1 dyn/cm² mais cette valeur augmente quand le diamètre des vaisseaux diminue (Ballermann, Dardik, Eng, & Liu, 1998). C'est pourquoi dans la littérature, les tests *in vitro* sont menés avec des valeurs de l'ordre de 10-20 dyn/cm² (10 dyn/cm² (Baguneid et al., 2004), 12 dyn/cm² (Chiu et al., 2003), 15 dyn/cm² (Wallace & Truskey, 2010) et 20 dyn/cm² (Hergenreider et al., 2012)). Des montages dédiés sont disponibles pour l'étude du cisaillement sur les structures tubulaires (Mohebbi-Kalhari et al., 2012; Moreno et al., 2011) et planes, tels que celui présenté Figure 2-13.

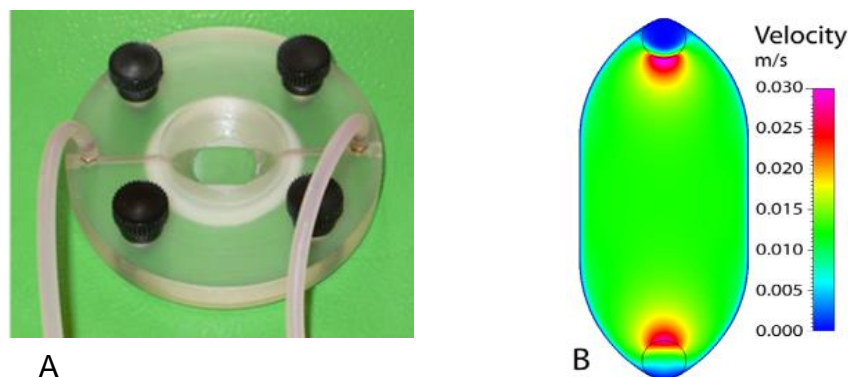


Figure 2-13 : Système d'étude en condition de cisaillement (Anderson & Knothe Tate, 2007).

CHAPITRE 3 STRATÉGIE

3.1 Description

En établissant la frontière des connaissances dans le domaine (*cf.* Chapitre 2), le choix des éléments de notre stratégie s'est dessiné. Plusieurs d'entre eux sont déjà à disposition de par les études antérieures de notre groupe et des laboratoires partenaires de ce projet. Avant de les énoncer, rappelons l'objectif général qui est le développement d'un revêtement multifonctionnel de prothèse synthétique possédant les caractéristiques suivantes :

- Applicable à une structure polymérique aux propriétés mécaniques définies (*e.g.* compliance) *sans l'endommager* ;
- Résistant à l'adsorption de protéines et l'adhésion plaquettaire, i.e. *non thrombogène* ;
- Favorable à l'adhésion et la prolifération de cellules endothéliales, i.e. *endothélialisable* ;
- Défavorable à la prolifération des cellules musculaires lisses, i.e. *ne contribuant pas à l'hyperplasie néointimale*.

La *prothèse synthétique* dont il est question a été développée par Moreno et collègues (Moreno et al., 2011), partenaires de ce projet, et est décrite dans la partie 2.1.4. Il s'agit de structures non-tissées de PET dont les propriétés mécaniques ont été optimisées pour correspondre aux attentes pour de telles prothèses. Un des défis majeurs dans la conception de prothèses de petit diamètre est donc atteint, et le second doit être relevé (*cf.* partie 1.3.2).

L'expertise de notre groupe sur les biomatériaux protéinés est alors entrée en jeu. Nous rapportons dans cette thèse l'amélioration de la ré-endothélialisation de la prothèse de PET par le *greffage à la fois de peptides d'adhésion et de facteur de croissance*, connus pour leur rôle sur les cellules endothéliales (*cf.* partie 2.3.3). Lors de cette biofonctionnalisation, l'accent a été mis sur le *développement et l'utilisation de méthodes de caractérisation appropriées*. L'idée est de permettre un contrôle rigoureux des modifications apportées à la structure, en termes de *conservation des propriétés mécaniques* (*cf.* parties 2.1.1 et 2.6.1) et de *contrôle/optimisation des densités de peptides/protéines greffées* (*cf.* parties 2.5.2.5 et 2.6.2).

Enfin, pour assurer une action spécifique aux cellules endothéliales, et non aux plaquettes et cellules musculaires lisses, une *composante anti-thrombogène* a été ajoutée au revêtement et les

biomolécules ont été judicieusement sélectionnées dans la littérature pour *leur rôle spécifique sur les cellules endothéliales*.

3.2 Hypothèses

Hypothèse 1. Les structures de PET peuvent être fonctionnalisées efficacement sans affecter leurs propriétés mécaniques par voie chimique (*cf.* partie 2.5.1).

Hypothèse 2. L'utilisation d'un espaceur à base de polyéthylène glycol (PEG) permet d'assurer une faible thrombogénicité des surfaces et d'étudier spécifiquement le rôle des biomolécules greffées (*cf.* parties 2.2.4 et 2.5.2.4).

Hypothèse 3. Il existe un peptide permettant l'adhésion sélective des cellules endothéliales par rapport aux cellules musculaires lisses et aux plaquettes (*cf.* partie 2.3.3.1).

Hypothèse 4. Un revêtement de dextrane représente une alternative naturelle et moins coûteuse au PEG (*cf.* hypothèse 2 et partie 2.2.4).

Hypothèse 5. Le facteur de croissance VEGF améliore la prolifération des cellules endothéliales mais pas celle des cellules musculaires lisses (*cf.* parties 2.3.3.2 et 2.4.2).

Hypothèse 6. La densité de peptides/protéines greffés a une influence importante sur les effets cellulaires observés et peut être optimisée (*cf.* partie 2.5.2.5).

Hypothèse 7. La co-immobilisation de peptides d'adhésion et de VEGF amène une synergie au niveau de l'adhésion et de la prolifération cellulaire, pouvant être optimisée en jouant sur les densités (*cf.* partie 2.3.3.3).

3.3 Objectifs spécifiques

Chacun des trois objectifs suivants a été au cœur de publications distinctes, présentées dans les chapitres 4, 5 et 6, respectivement.

Objectif 1. Amener des groupements réactifs à la surface des structures de PET sans en affecter les propriétés mécaniques (Hyp. 1).

Objectif 2. Développer un revêtement permettant à la fois l'adhésion de cellules endothéliales et la résistance à l'adhésion de plaquettes (Hyp. 2, 3 et 6).

Objectif 3. Développer un revêtement assurant l'adhésion et la prolifération de cellules endothéliales sans favoriser la prolifération des cellules musculaires lisses (Hyp. 3 à 7).

3.4 Composantes des revêtements développés

1. *Un long polymère aminé, tel que le polyvinylamine (PVAm) ou le polyallylamine (PAAm)*, a été employé pour atteindre l'objectif 1 en se basant sur l'hypothèse 1. Plus précisément, nous supposons ici que le greffage de PVAm (ou PAAm) se limitera à la surface des structures, du fait d'une faible diffusion, et n'affectera pas les propriétés du volume. Les deux polymères seront considérés comme équivalents (*cf.* Annexe A).
2. *Un espaceur/lien tel que le PEG et le dextrane* a été greffé aux amines primaires du PVAm (ou PAAm). Les hypothèses 2 et 4, basées sur la littérature, ont orienté nos choix vers ces macromolécules. Ces intermédiaires entre la surface et les biomolécules auront pour rôle à la fois d'assurer l'anti-thrombogénicité et de permettre l'étude spécifique du rôle des biomolécules en évitant l'adsorption de protéines.
3. *Les peptides d'adhésion REDV, CAG et YIGSR, ainsi que RGD (contrôle positif)* ont été retenus et testés pour atteindre l'objectif 2 en se basant sur l'hypothèse 3.
4. *Le peptide K5 et son partenaire E5-VEGF* ont également été incorporés au revêtement avec le peptide d'adhésion retenu, pour atteindre l'objectif 3 en se basant sur les hypothèses 5 et 7.

3.5 Considérations pratiques

3.5.1 Substrats utilisés

Les structures de PET présentées à la partie 2.5.1 n'ont été utilisées que pour le premier article présenté dans cette thèse en Chapitre 4. Par la suite, des films de PET (*cf.* Chapitre 5) et des plaques à puits (*cf.* Chapitre 6), tous deux fonctionnalisés avec le PVAm (ou le PAAm), ont été employés.

Ce changement de substrat a été fait pour plusieurs raisons :

- Par souci de commodité et d'économie : la manipulation de substrats fibreux est moins aisée que celle de plaques à puits ou de films, et nécessite une quantité de matériel plus importante. L'utilisation de substrats plus simples a ainsi permis de multiplier les contrôles et caractérisations (*cf.* partie 3.5.2)

- Pour faciliter la comparaison à la littérature : notamment lors de l'étude des densités, les substrats 2D (films, puits) sont plus courants et moins spécifiques que les structures fibreuses ;
- Du fait de l'arrêt du projet au CNRC (après le Chapitre 4), nous empêchant l'accès aux bancs d'essai pour les tests sur structures tubulaires.

Toutefois, le fait que la première couche du revêtement soit faite du même polymère aminé devrait faciliter le transfert aux structures réalistes *in fine*. Quelques résultats de transfert aux structures non-tissées sont présentées en Annexe E.

3.5.2 Caractérisation et contrôle

Tout au long de la thèse, une attention particulière a été portée à la caractérisation des revêtements développés et à l'utilisation de contrôles appropriés.

L'objectif 1, imposant une double caractérisation mécanique et chimique, a mené à l'utilisation d'une méthode rapide, simple et peu coûteuse pour caractériser la densité de groupements réactifs. Une première publication de méthodologie a ainsi été issue des travaux de cette thèse et écrite en collaboration avec un collègue (Noel, Liberelle, Robitaille, & De Crescenzo, 2011).

Lors de la réalisation de l'objectif 2, des séquences peptidiques mutantes (*e.g.* RGE et REVD) ont été utilisées comme contrôle, ce qui est malheureusement rarement fait (Tableau 2-3). Tous les peptides ont été greffés de manière covalente et spécifique au thiol, via l'ajout d'une étiquette Cys-Gly-Gly (*cf.* Annexe D). Considérant l'hypothèse 6, l'adhésion cellulaire a été étudiée en fonction de la densité de peptides.

Lors de la réalisation de l'objectif 3, VEGF a été capturé de manière stable et orientée par le peptide K5 préalablement greffé de manière covalente (tout comme les peptides d'adhésion). Ce type de capture est rarement employé au profit de la chimie carbodiimide (Tableau 2-4), plus simple mais présentant de nombreux défauts quant à l'orientation des protéines (*cf.* partie 2.5.2.2). La densité de VEGF étant rarement caractérisée (Tableau 2-4) et variée (Tableau 2-6), elle a été considérée dans ce projet et scrupuleusement caractérisée par des méthodes dérivées de l'ELISA.

CHAPITRE 4 ARTICLE 1 – A NON-DAMAGING CHEMICAL AMINATION PROTOCOL FOR POLY(ETHYLENE TEREPHTHALATE) – APPLICATION TO THE DESIGN OF FUNCTIONALIZED COMPLIANT VASCULAR GRAFT

Protocole d'amination chimique douce pour poly(éthylène téréphtalate) – Application à la fonctionnalisation de prothèses vasculaires compliantes

Cet article adresse l'objectif 1 : « Amener des groupements réactifs à la surface des structures de PET sans en affecter les propriétés mécaniques » en se basant sur l'hypothèse 1 : « Les structures de PET peuvent être fonctionnalisées efficacement sans affecter leurs propriétés mécaniques par voie chimique ».

4.1 Résumé

Diverses approches de bioingénierie ont été employées pour créer des prothèses vasculaires de petit diamètre utilisant des matériaux synthétiques. Cependant, aucune structure suffisamment performante n'est encore disponible. Dans cette étude, nous présentons la première étape d'un procédé visant à la biofonctionnalisation de prothèses compliantes de PET, préalablement conçues (Moreno et al., 2011). Le principal défi pour une telle modification de surface est de prévenir les dommages infligés au matériau, de façon à ce qu'il préserve les propriétés mécaniques obtenues lors de sa conception. Dans ce but, un long polymère aminé (le polyvinylamine, PVAm) a été utilisé comme agent d'aminolyse pour créer des fonctionnalités amines ($-NH_2$) uniquement en surface du PET. Différentes conditions expérimentales ont été testées, menant à une large gamme de densités de groupement amines associée à de faibles variations des propriétés élastiques de structures planaires. Ces résultats contrastent avec ceux obtenus avec un diamine commun (l'éthylènediamine, EtDA), conduisant à une forte dégradation des propriétés mécaniques à densités d'amines comparables. Des essais mécaniques sur tubes ont été finalement menés après fonctionnalisation de structures de PET tubulaires avec le PVAm. Dans certaines conditions, ces structures fonctionnalisées avaient conservé leurs propriétés de compliance proche des artères, similairement aux structures de PET non modifiées.

4.2 Header

A NON-DAMAGING CHEMICAL AMINATION PROTOCOL FOR POLY(ETHYLENE TEREPHTHALATE) – APPLICATION TO THE DESIGN OF FUNCTIONALIZED COMPLIANT VASCULAR GRAFT

Samantha Noel^a, Benoît Liberelle^a, Alvaro Yogi^b, Maria J. Moreno^b, Martin N. Bureau^{c,a}, Lucie Robitaille^c and Gregory De Crescenzo^{*a}

4.3 Abstract

Bioengineering approaches have been intensively applied to create small diameter vascular grafts using artificial materials. However, a fully successful, high performing and anti-thrombogenic structure has not been achieved yet. In this study, we present the first step of a process aiming at biofunctionalizing previously designed compliant polyethylene terephthalate (PET) scaffolds (Moreno et al., 2011). The main challenge of such surface modification is to prevent the bulk polymer from any damage, so that it preserves the mechanical properties the structures have been designed for. In that endeavor, an aminated long-chain polymer (polyvinylamine, PVAm) was used as an aminolysis reagent to get amine ($-NH_2$) moieties only on the very surface of PET. Different reaction conditions were assayed, leading to a large range of amino group densities associated with slight variations of the planar tensile properties. These results were in stark contrast with those generated with a common small diamine substrate (ethylenediamine, EtDA), as the latter yielded a strong degradation of the mechanical properties for comparable amine densities. Tubular mechanical assays were then carried out on PVAm-functionalized PET scaffolds. The latter showed a compliance match with arteries for chosen reaction conditions, as initially observed for pristine PET tubular scaffolds.

4.4 Keywords

Vascular graft, Compliance mismatch, Polyethylene terephthalate, Polyvinylamine, Aminolysis.

4.5 Introduction

Vascular diseases are one of the major causes of disability and mortality in the world (Roger et al., 2011). Artificial vascular grafts are being developed to treat these diseases while overcoming the obvious limitations of bypass grafting with autologous vessels. Synthetic vascular grafts made from non-resorbable materials such as expanded polytetrafluoroethylene (ePTFE) porous membranes and polyethylene terephthalate (PET) woven fibers (DacronTM) are currently the gold standard references for large diameter arteries replacement (> 6 mm diameter) (Bui et al., 1993; Devine & McCollum, 2004). However, for smaller diameter vessel substitution, these grafts did not prove to be efficient, due to their thrombogenicity and low patency (Seifalian, Tiwari, Hamilton, & Salacinski, 2002; Tiwari, Salacinski, Hamilton, & Seifalian, 2001). Limitations of their clinical outcome originate also from their considerably low mechanical compliance when compared to native arteries (Bureau et al., 2009; Moreno et al., 2011; Salacinski et al., 2001; Tai et al., 2000) and their poor bioactivity (i.e., lack of beneficial cell-material interactions, leading to platelet adhesion) (Ventre, Netti, Urciuolo, & Ambrosio, 2009).

In an attempt to address both compliance and thrombogenic issues associated with small diameter vascular grafts, novel nonwoven structures made of PET microfibers obtained from a melt-blowing process were studied as vascular substitutes. Such structures were already shown to match mechanical properties of native arteries, in terms of compliance and burst pressure (Bureau et al., 2009; Moreno et al., 2011). We believe that the biofunctionalization of these structures would likely improve cell adhesion and reendothelialization on those PET grafts, thus addressing thrombogenicity issues.

Polyethylene terephthalate (PET) is a linear aromatic polyester featuring unique mechanical and physical properties as a biomaterial, especially for vascular applications (Bide et al., 2006; Marchand-Brynaert et al., 1995; Muthuvijayan et al., 2009). Nevertheless, PET is inert and lacks active functional groups (Goddard & Hotchkiss, 2007; Ito, 2008; Jiao & Cui, 2007; Ma et al., 2007). Surface functionalization is therefore required for immobilizing biomolecules of interest onto PET-based devices. In that endeavor, many physical and chemical protocols have been explored to add chemically reactive functional groups onto PET surfaces. Among the physical techniques, plasma methods were extensively used to modify the very surface of PET with either amino groups (Desmet et al., 2009; Öteyaka, Chevallier, Turgeon, Robitaille, & Laroche, 2012; Schröder et al.,

2001; Siow et al., 2006) or carboxyl groups (Desmet et al., 2009; Gupta, Plummer, Bisson, Frey, & Hilborn, 2002; Hu, Yin, Mao, Tamada, & Knoll, 2003; Siow et al., 2006). However these techniques are costly, tedious and sometimes toxic for applications in the biomedical field (Goddard & Hotchkiss, 2007; Schröder et al., 2001; Siow et al., 2006). Furthermore, surface modification was reported to be difficult to control due to the large variety of functional groups formed by plasma treatments (Schröder et al., 2001), as well as to the aging effects occurring on plasma modified polymers (*e.g.*, post-plasma oxidation) (Goddard & Hotchkiss, 2007; Siow et al., 2006).

In a functionalization process, moiety densities need to be both controlled and optimized in order to obtain significant surface modification while avoiding surface crowding (Goddard & Hotchkiss, 2007). The alternative to plasma strategies offering that opportunity is wet chemistry. A number of chemical routes have been tested to functionalize PET surfaces, including hydrolysis (Chen & McCarthy, 1998; Liu et al., 2005; Marchand-Brynaert et al., 1995) and aminolysis (Bech et al., 2007; Bui et al., 1993; Irena et al., 2009; Nissen et al., 2008) reactions allowing to expose reactive carboxyl and amino groups, respectively. Those chemical techniques have been widely used to graft bioactive compounds onto PET, and proved successful according to biochemical characterizations (Bech et al., 2007; Chollet, Chanseau, Brouillaud, & Durrieu, 2007; Inoue, Imamura, Hirano, & Tabata, 2009; Irena et al., 2009). However, those lysis reactions induce chain scissions that can reach into the bulk material and thus strongly impact the PET material mechanical properties (Avny & Rebenfeld, 1986; Bech et al., 2007; Ellison et al., 1982; Fukatsu, 1992; Irena et al., 2009; Liu et al., 2005; Muthuvijayan et al., 2009). Although well-known, that common drawback has mostly been disregarded and remains an unaddressed issue of major importance for long-term applications such as vascular implants.

In this study, we are addressing these wet chemistry caveats in order to provide an efficient method for PET amination that modifies only the very surface of the polymer as in the case of plasma treatments. In our approach, a long polymer (25 kDa) displaying multiple amines, namely polyvinylamine (PVAm), was used as an alternative aminolysis reagent. As PVAm reacts with PET in alkaline conditions, NaOH-based hydrolysis may negatively impact PET mechanical properties; the impact of pH, upon both mechanical properties and amine densities of our PET structures, has been thoroughly studied. A comparison of the PVAm aminolysis treatment to another relying on ethylenediamine (EtDA) outlined that, for similar amine densities, our approach

was superior for preserving the mechanical properties of our PET structures. Finally, the PVAm treatment was applied to tubular scaffolds mimicking small arteries to assess if the compliance properties, of crucial importance for such applications, were preserved.

4.6 Experimental

4.6.1 Chemicals and reagents.

Milli-Q quality water (18.2 M Ω .cm; total organic compounds (TOC) = 4 ppb) was generated with a Millipore Gradient A 10 purification system. Sodium hydroxide (NaOH, 99.3% purity), cysteine (99+% purity), isopropanol (99.5% purity), ethanol (EtOH, 99.9% purity), methanol (MeOH, 99.9% purity), dioxane (99+% purity) and hydrochloric acid (HCl, 37.7% v/v) were obtained from VWR International, Ltd. (Mont-Royal, QC). Orange II sodium salt (92% purity), cysteine (99+% purity), phosphate buffered saline (10 mM PBS, NaCl – 0.138 M, KCl – 0.027 M, pH 7.4) and potassium chloride (KCl, 99+% purity) were purchased from Sigma-Aldrich Canada, Ltd. (Oakville, ON). Ethylenediamine (EtDA, 99+% purity) was purchased from Fisher Scientific, Ltd. (Nepean, ON). The linear aminated polymer polyvinylamine (PVAm) was obtained from Polysciences, Inc. (Warrington, PA). Succinimidyl 6-[3-(2-pyridyldithio)-propionamido]hexanoate (LC-SPDP, 95+% purity) was obtained from Pierce Biotechnology, Inc. (Rockford, IL).

4.6.2 Fabrication of PET structures

Polyethylene terephthalate (PET) structures were produced as previously described by Moreno et al. (structures designated as E) (Moreno et al., 2011). Briefly, neat PET (Dupont, Wilmington, DE, USA), with an inherent viscosity of 1, was used to produce nonwoven fibers using the melt-blowing process. PET was extruded through a die containing 230 aligned holes (ca. 300 μ m in diameter). Air was blown at very high speed (close to the speed of sound) through a narrow gap sideways of the die resulting in the stretching of the fibers. PET planar mats were elaborated by juxtaposition of 20 individual layers of fiber webs with alternating orientations (0°/90°) onto a metallic plate. PET tubular scaffolds were elaborated onto a 6-mm diameter mandrel as described by Moreno et al. (Moreno et al., 2011) but with 8 additional layers, 4 layers with 0° fiber orientation in the luminal side and 4 layers with 90° orientation in the abluminal side. These extra layers were added to the

scaffolds for future cell seeding experiments to stimulate the growth and spreading of the vascular cells in the same orientation as they typically present in the native vessels. The plate or the mandrel were sealed in a vacuumed bag, and then inserted in an oven with controlled temperature (90°C) and under vacuum (100 kPa) during 30 min for consolidation. Distributions of pore and fiber sizes in such structures are described in our previous study (Moreno et al., 2011).

4.6.3 Chemical treatments on PET structures

4.6.3.1 Surface preparation

All glassware was carefully cleaned by overnight immersion in a bath of KOH-saturated isopropyl alcohol, followed by intensive rinsing with Milli-Q water. The PET mats were intensively rinsed in methanol and Milli-Q water and then dried in a laminar flow cabinet at room temperature.

4.6.3.2 Ethylenediamine (EtDA) functionalization

The protocol was adapted from those previously described in the literature (Bech et al., 2007; Irena et al., 2009). Briefly, PET mats were immersed in a reactive EtDA/methanol solution for 30 min at 50 °C. Four concentrations of EtDA (ranging from 30 to 36% v/v, by 2% steps) were tested.

4.6.3.3 Polyvinylamine (PVAm) functionalization

PVAm was grafted on both PET planar mats and tubular scaffolds through protocols adapted from other works (Dimitrievska et al., 2011). Briefly, an alkaline solution of NaOH and KCl (1:1, 150 mM in Milli-Q water) was prepared, as well as a solution of PVAm·HCl (120 g/L in Milli-Q water). PET mats were immersed in a mix of the alkaline solution, the PVAm solution and dioxane (67:26:7% v/v), leading to a 8 g/L solution of PVAm·HCl. Prior to dioxane addition, pH was adjusted to a specific value (ranging from 11.25 to 12.25) by adding few μ L of 12.3 M HCl, followed by subsequent vortexing. After sample immersion, solutions were sonicated for 20 min and the reaction was then carried out for 24 h at 70°C.

4.6.3.4 Hydrolysis

As a control treatment, a mix of an alkaline solution of NaOH and KCl (1:1, 150 mM in Milli-Q water) and dioxane (74:26 v/v) was prepared. Prior to dioxane addition, pH was adjusted to a specific value (ranging from 11.4 to 12.25) by adding few μ L of 1M HCl followed by subsequent

vortexing. After the PET mats immersion, the solutions were sonicated for 20 min and the reaction was then carried out for 24 h at 70°C.

4.6.3.5 Washing

At the end of each of the three reactions, the mats were rinsed with Milli-Q water and ethanol, washed again with Milli-Q water, and finally air-dried.

4.6.4 SEM imaging

Pristine and treated PET mats were observed under a scanning electron microscope (SEM; JSM-6100 Scanning Microscope, JEOL, Japan) at an accelerating voltage of 5.0 kV, to qualitatively assess the roughness and degradation of the mats.

4.6.5 Characterization of mechanical properties

4.6.5.1 Tensile testing

Individual PET mats were tested for tension at room temperature using a 2 kN load cell at a crosshead speed of 10 mm/min according to ASTM D3822. Small pneumatic clamps were used to grip individual mats. Sample gauge length and width were 25 mm and 5 mm, respectively. Samples were cut along one of the fibers main direction (90°-oriented mats) unless mentioned otherwise. Mats thickness was measured six times along each sample and the average value was used for parameter calculations. Strength at yield and strain at maximum load were obtained from the load-deflection curves. Five specimens were tested per condition.

4.6.5.2 Compliance and burst pressure measurements

Dynamic compliance measurements were performed on tubular scaffolds in a pulsatile pressure bioreactor (Tissue Growth Technology (TGT), Minnetonka, MN, USA). To prevent fluid leakage from the pore structure of the scaffolds, thin latex tubes were inserted into the lumen of the scaffolds. Hank's balance salt solution (HBSS) was circulated through a flow loop into the scaffold at a flow rate of 100 ml/min, under physiological pulsatile pressure (120/80 mmHg) and 1 Hz frequency. The outer diameter of the scaffolds was measured during the changes in pressure with a light emitting diode (LED) micrometer (Keyence, LS7600, Osaka, Japan). Luminal pressure was measured with a pressure transducer (RK-68075-10, Cole-Parmer). Both flow rate and pressure

signals were automatically acquired by TissueWork software (Minnetonka, MN, USA). The outer diameter signals were recorded using USB serial convertor software, OP-84114 and Setting and Support software, Ls-H1W (Keyence, LS7600, Osaka, Japan).

Real-time pressure and distension data with pulsatile pressure was used to calculate the dynamic compliance according to equation (1) and expressed as percentage change per mmHg. (Salacinski et al., 2001)

$$\text{Compliance } (\% \text{ mmHg}^{-1}) = \frac{D_{\text{sys}} - D_{\text{dia}}}{D_{\text{dia}} (P_{\text{sys}} - P_{\text{dia}})} \times 100 \quad (1)$$

where P_{sys} and P_{dia} are systolic (120 mmHg) and diastolic (80 mmHg) intraluminal pressure, respectively. D_{sys} and D_{dia} are the systolic and diastolic outer diameter of the scaffold, respectively.

Burst pressure measurements were performed on the tested tubular scaffolds (nonwoven PET fiber structures) by increasing the internal air pressure inside a balloon until burst. Both applied pressure and scaffold diameter variation upon applied pressure were acquired.

4.6.6 Characterization of amino group densities

A previously validated colorimetric method, namely the Orange II method (Noel et al., 2011), was used to quantify the amount of exposed primary amine groups on PET surfaces. Weights of EtDA- and PVAm-coated structures were determined prior to the colorimetric assay. The amino-covered structures were immersed in 1.5 mL of dye solution (14 mg/mL) in acidic solution (Milli-Q water adjusted to pH 3 with 1 M HCl) for 30 min at 40 °C. The samples were then thoroughly rinsed three times using the acidic solution (pH 3) to remove unbound dye. Once air-dried, the colored structures were immersed in 1 mL of Milli-Q water adjusted to pH 12 with a 1 M NaOH solution for 15 min at room temperature. The pH of the solution containing the desorbed dye was eventually adjusted to pH 3 by adding 1% v/v of 12.3 M HCl. The absorbance of the solution was then measured at 484 nm.

4.6.7 Functionalization with L-cysteine

PVAm-modified PET planar mats were reacted with LC-SPDP molecules, as previously described (Boucher et al., 2009; Noel et al., 2011). Briefly, amino-modified mats were placed in test tubes containing 1.0 mL of 1 mM LC-SPDP in 10 mM phosphate buffer (10% v/v DMSO) for 150 min

at 40°C. The mats were rinsed by soaking them in DMSO, in 10 mM phosphate buffer (pH 7.4) and in Milli-Q water. In a second step, the dried mats were incubated in 25 mM L-cysteine solution (1 M NaCl in 0.1 M sodium acetate, pH 4.0) for 1 h at room temperature. The absorbance of released 2-pyridinethiol groups allowed for the quantification of grafted L-cysteine density.

4.6.8 Statistical analysis

When mentioned in the corresponding figure captions, one-way analysis of variance (ANOVA) was performed and Bonferroni post-hoc test was used to extract the treated groups that were significantly different from the pristine one, at either a 95% (*) or a 99.5% (**) confidence level.

4.7 Results

Tensile testing of PET planar mats was used to compare various chemical treatments, namely PVAm-based aminolysis (at different pH) and its side-reaction (i.e. NaOH-based hydrolysis) as well as EtDA-based aminolysis. Two parameters were extracted from the tensile curves in order to describe the treated and pristine PET mats, i.e. the strength at yield (1%) and the strain at maximum load. The former represents the load below which the induced deformations are still reversible, whereas the latter illustrates the mats behavior beyond the elastic domain, close to the breaking point. In that study, the strength at yield was considered as an indicator of the global mechanical behaviour of treated PET mats under static conditions. In parallel, the strain at maximum load was used to identify the presence of treatment-induced local defects being responsible for premature breaking.

For comparison with the reported mechanical properties of human arteries, PVAm-treated PET tubular scaffolds were tested under pressure in order to get compliance and burst pressure values. The former characterizes the dynamic elastic behavior of the scaffolds under physiological pressure and the latter defines the critical pressure not to exceed.

PVAm- and EtDA-based functionalization methods were also compared in terms of resulting amino group density using the Orange II method (Noel et al., 2011).

4.7.1 Pristine PET mats

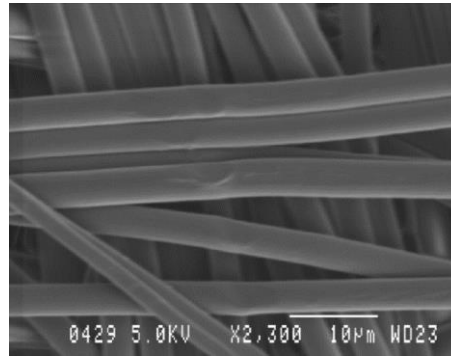


Figure 4-1 : SEM imaging of pristine PET planar mats

The melt-blown PET structures (Figure 4-1), whose mechanical properties are described in Table 1, are made of 20 webs of nonwoven fibers, successively stacked with alternative orientations of 0 and 90° (Moreno et al., 2011). Samples were cut along a main direction (90°-oriented mats) or on the web bisector (45°-oriented mats). Accordingly, tensile curves and derived mechanical properties reflected the mats anisotropy (Figure 4-1).

Tableau 4-1 : Description of pristine PET structures by mechanical testing of both planar mats and tubular scaffolds.

	Parameters	Data
Planar mats	Strength at yield (N)	1.83 ± 0.21 (at 45°) ^a 2.72 ± 0.19 (at 90°) ^a
	Strain at maximum load (%)	48.3 ± 5.6 (at 45°) ^a 28.2 ± 3.6 (at 90°) ^a
	Compliance (% mmHg ⁻¹ 10 ⁻²)	9.6 ± 0.6 ^b (Arteries: 8.5 ± 2.8) ^c
Tubular scaffolds	Burst pressure (mmHg)	3120 ± 347 ^b (Arteries: 3711 ± 728) ^d

^a Strength at yield (1%) and strain at maximum load were derived from tensile testing made on planar samples (5 mm × 25 mm) that were cut along either the 90°-direction or the 45°-direction referring to the webs orientation (0/90°) ($n = 10$).

^b Compliance and burst pressure measurements were carried out as described in the Experimental section on 6-mm diameter scaffolds ($n = 3$).

^c Average ± standard error of values reported in literature (Konig et al., 2009; Salacinski et al., 2001; Tai et al., 2000)

^d Average ± standard error of values reported in literature (Konig et al., 2009; L'Heureux et al., 2006)

The strength at yield was found to be higher for 90°-oriented (2.69 ± 0.14 N) than for 45°-oriented PET mats (1.83 ± 0.21 N). However, the strain at maximum load was lower for 90°-oriented ($28.2 \pm 3.6\%$) than for 45°-oriented mats ($48.3 \pm 5.6\%$) (Tableau 4-1). Mechanical properties derived

from 90°-oriented tensile testing would thus be more sensitive to defects in the materials. Accordingly, 90°-oriented samples were treated and tested in the following assays.

4.7.2 PVAm-aminolysis on PET tubular mats

Polyvinylamine (PVAm) was put to react with PET mats and PET scaffolds following an aminolysis-type reaction schematized in Figure 4-2-A. This proposed reaction scheme was previously justified, as the amide bond formation between PVAm and PET was supported by XPS measurements (Noel et al., 2011).

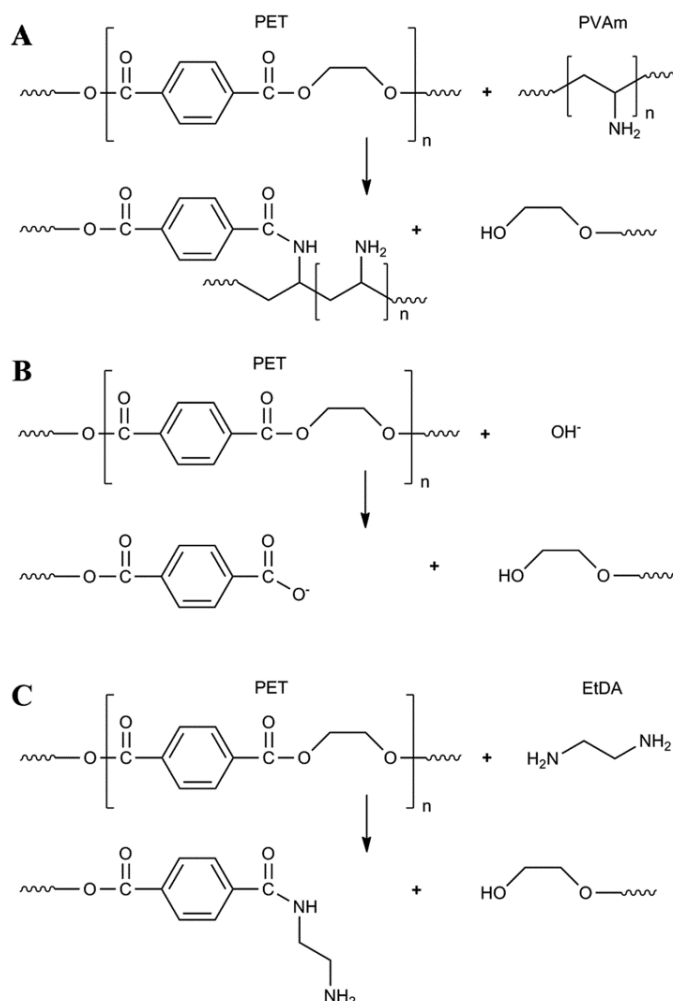


Figure 4-2 : Reactions schemes between PET and (A) PVAm, (B) NaOH and (C) EtDA.

We first studied how the pH of the reaction affected the aminolysis reaction as well as the PET mechanical properties on PET mats (Figure 4-3 and Figure 4-4-A, black squares). The amino group density of PVAm-treated mats was found to substantially increase as a function of pH, ranging from $7.2 \pm 0.6 \mu\text{mol/g}$ (pH 8) to $78.3 \pm 3.1 \mu\text{mol/g}$ (pH 12.25), showing a threshold point at pH 11.7 (Figure 4-3, black squares).

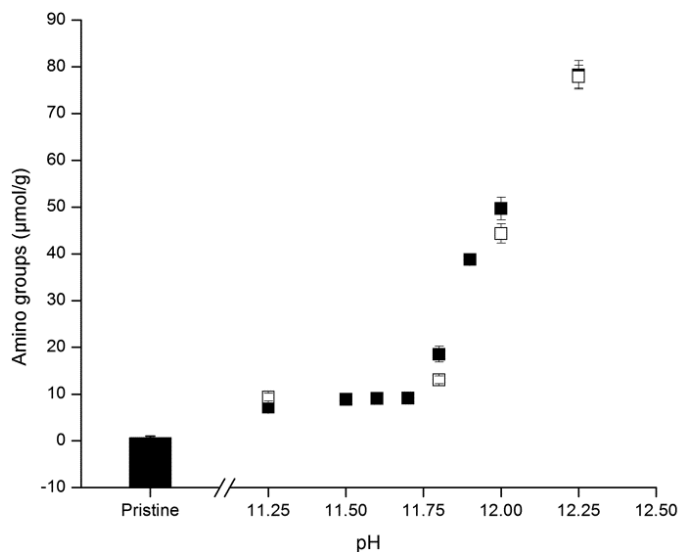


Figure 4-3 : Amino group densities resulting from PVAm treatment of PET planar mats (solid squares, ■) and tubular structures (empty squares, □), as a function of the pH of the reaction (n = 3).

Note that pristine PET mats were also characterized in terms of amino group densities as a negative control, showing a negligible amount of moieties ($0.10 \pm 0.03 \mu\text{mol/g}$). As shown on Figure 4-4-A (squares), the strength at yield of PVAm-treated mats was found to slowly decrease as a function of pH, from $2.72 \pm 0.19 \text{ N}$ for the pristine mats to $2.33 \pm 0.15 \text{ N}$ for the mats treated at pH 12.25, i.e. 15% loss (black squares). The loss was found to be significant only for pH above 11.9. The strain at maximum load was found to be more altered, leading to a 65% loss at pH 12.25 when compared to pristine mats (9.8 ± 1.7 vs $28.2 \pm 3.6\%$, respectively) (Figure 4-4-A, gray squares). SEM images corresponding to the extreme condition, i.e. pH 12.25 (Figure 4-4-B), did not reveal any defects on the fibers surface when compared to pristine mats (Figure 4-1).

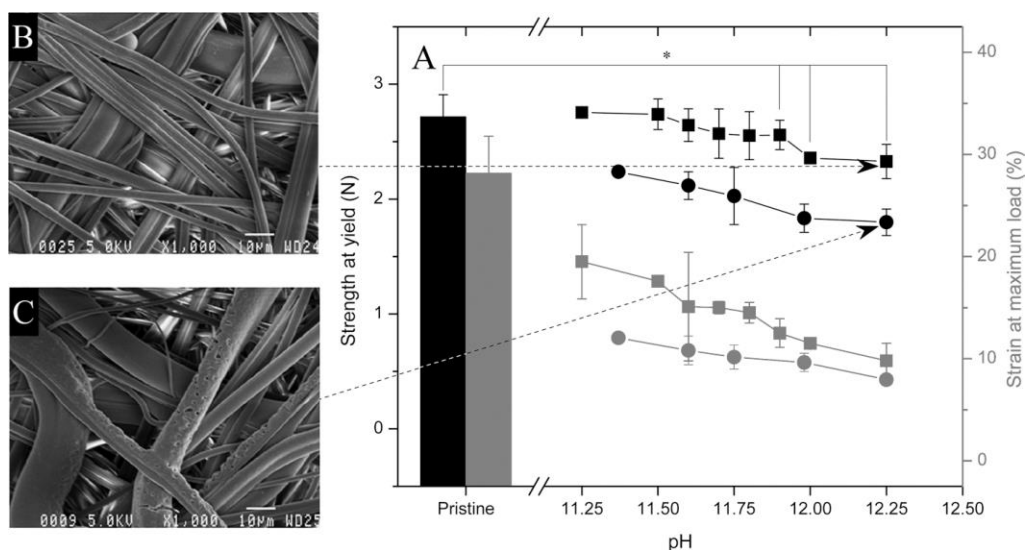


Figure 4-4 : Mechanical characterization of the PVAm treatment of PET mats. (A) Mechanical properties of the treated mats, i.e. strength at yield (black symbols, $n = 5$) and strain at maximum load (gray symbols, $n = 5$), are represented as a function of the pH of the solution (prior to dioxane addition) for PVAm treatment (squares) and for NaOH treatment (circles), for comparison. For the strength at yield of PVAm-treated mats (black squares), Bonferroni-ANOVA was performed (* means $p < 0.05$). Complementary SEM imaging was carried out on (B) PVAm-covered and (C) hydrolyzed mats, both treated at pH 12.25.

Of interest, reaction parameters such as temperature and reaction time were also varied following a design of experiments. However, these parameters were found to influence the aminolysis reaction to a lesser extent (data not shown).

4.7.3 Subsequent functionalization with L-cysteine

As an example of subsequent bioconjugation, a commonly used heterobifunctional linker (LC-SPDP) was chemically grafted on PET planar mats previously treated with PVAm at pH 12 (Boucher et al., 2009; Noel et al., 2011). The amine reactive N-hydroxysuccinimide (NHS) ester group of LC-SPDP reacted with the free primary amines on the modified PET surfaces at pH 7.4, to form a stable amide bond. The pyridyl disulfide group, located by the other end of the LC-SPDP linker reacts specifically with thiol groups. Such a linker enables an immobilization of any cysteine-tagged protein, as well as its quantification by UV readout thanks to the 2-pyridinethiol release induced by the reaction. Thereby, L-cysteine was reacted with the LC-SPDP-modified planar mats, leading to a grafting yield of $69.6 \pm 3.6\%$ on pH 12-treated mats, i.e., 44.6 ± 0.5

$\mu\text{mol/g}$ of grafted L-cysteine for an initial amino group density of $64.5 \pm 3.7 \mu\text{mol/g}$ ($n = 3$, data not shown).

4.7.4 Hydrolysis on PET planar mats

As the PVAm-reaction mixture contained sodium hydroxide, NaOH-catalyzed hydrolysis of PET could have induced unwanted chain-scission by converting PET ester links into carboxylic acid and hydroxide functionalities (Figure 4-2-B). To assess the macroscopic effects of that side reaction, PET mats were immersed in different pH-adjusted solutions (ranging from 11.4 to 12.25) and characterized by tensile testing. The strength at yield was found to decrease as a function of pH, leading to a 34%-loss when compared to pristine mats (1.80 ± 0.12 vs 2.72 ± 0.19 N, respectively) (Figure 4-4-A, black circles). The strain at maximum load was also found to be affected by the treatment, leading to a 72%-loss when compared to pristine mats ($9.8 \pm 1.7\%$ vs $28.2 \pm 3.6\%$, respectively) (Figure 4-4-A, gray circles). For hydrolysis reaction performed at pH 12.25, the PET fibers presented extensive pitting as revealed by SEM (Figure 4-4-C), which had already been reported as characteristic of NaOH-hydrolysis (Ellison et al., 1982).

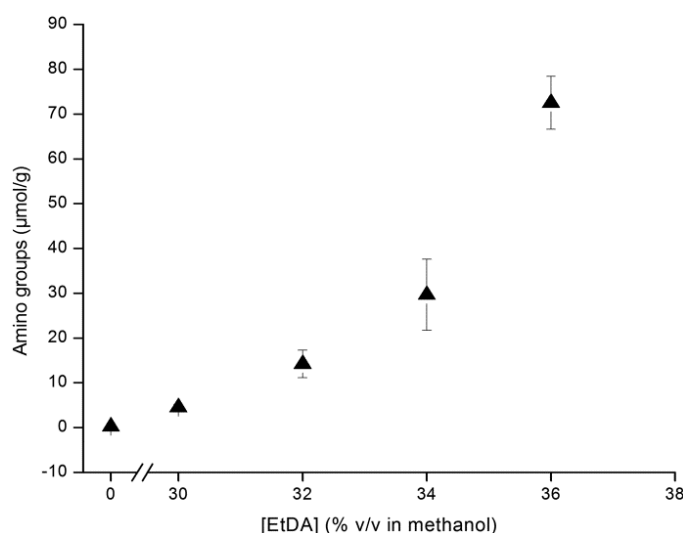


Figure 4-5 : Amino group densities resulting from EtDA treatment of PET mats, as a function of the EtDA concentration in methanol ($n = 3$).

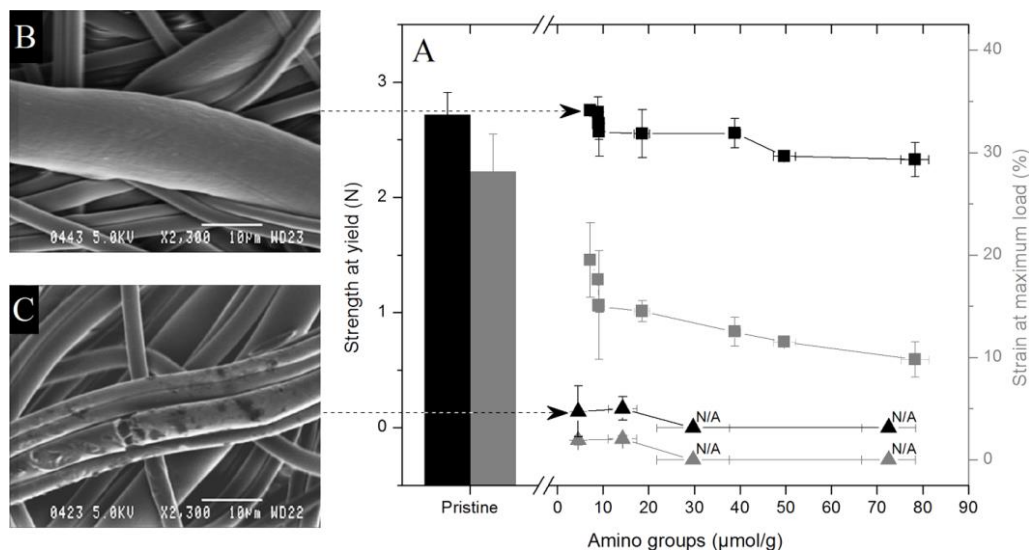


Figure 4-6 : Comparison of PVAm-based and EtDA-based aminolysis. (A) Mechanical properties of the treated mats, i.e. strength at yield (black symbols, $n = 5$) and strain at maximum load (gray symbols, $n = 5$), are represented as a function of the corresponding amino group density ($n = 3$), for both PVAm (squares) and EtDA treatment (triangles). Complementary SEM imaging was carried out on (B) PVAm-covered mats treated at pH 11.25 and (C) 30% EtDA-treated mats, both leading to low amino group density (7.2 ± 0.6 and $4.5 \pm 0.6 \mu\text{mol/g}$, respectively).

^{N/A} Those EtDA-treated PET mats were too damaged for handling and testing (34 and 36% v/v EtDA concentration) and the corresponding mechanical properties were set to 0 on the figure.

4.7.5 EtDA-aminolysis on PET planar mats

EtDA reacts with PET chains via the same chemical route as PVAm does (Figure 4-2-C). PET mats were treated with a solution of EtDA diluted in methanol (MeOH), as previously reported in the literature (Bech et al., 2007; Noel et al., 2011). EtDA concentrations were chosen to yield amino group densities comparable to those obtained with PVAm-aminolysis (Figure 4-5), i.e. densities ranging from $4.5 \pm 0.6 \mu\text{mol/g}$ to $72.5 \pm 5.9 \mu\text{mol/g}$ for 30 and 36% v/v EtDA solutions, respectively. The amine density was found to increase exponentially with EtDA concentration as previously reported (Noel et al., 2011). As a control, PET mats were immersed in MeOH under the same reaction conditions (denoted 0% on Figure 4-5). No significant difference was found between the mechanical properties of control mats and those of pristine PET mats, which indicates that the solvent itself did not induce any modification of the PET structures. EtDA-treated mats were strongly damaged, for all resulting amino group densities (Figure 4-6-A, triangles). For the lowest

EtDA concentration (i.e., 30% v/v), the strength at yield (Figure 4-6-A, black triangles) and the strain at maximum load (Figure 4-6-A, gray triangles) were of 0.54 ± 0.14 N and $1.91 \pm 0.42\%$, respectively, that is less than 10% of the initial properties of the control mats (2.54 ± 0.35 N and $30.18 \pm 6.59\%$ for 0%-treated PET mats). Note that tensile testing could not be performed for the highest EtDA concentrations (34 and 36% v/v EtDA) as the PET mats were too damaged to be handled. For the 30%-EtDA condition, SEM imaging revealed lots of cracking on the fibers (Figure 4-6-C), which is typical of aminolysis involving small diamine molecules.

4.7.6 PVAm-aminolysis on PET tubular scaffolds

PET tubular scaffolds were treated with PVAm following the same protocol and reaction as for PET mats. Four pH conditions were tested to explore the wide range of amino group densities resulting from the treatment. Those densities are reported on Figure 4-3 (empty squares) and were similar to those obtained on mats in the same conditions.

Compliance of PVAm-treated scaffolds (Figure 4-7, black columns) was found to be altered at low pH ($2.05 \pm 0.57\% \cdot 10^{-2} \text{ mmHg}^{-1}$ for pH 11.25) compared to $9.63 \pm 0.60\% \cdot 10^{-2} \text{ mmHg}^{-1}$ for pristine scaffolds ($p < 0.005$). However, for higher pH conditions (pH 12 and 12.25), the compliance values were not found to be significantly different from the control ($p > 0.05$). Similar observations could be made for burst pressure measurements (Figure 4-7, gray columns). At pH 11.25, a higher burst pressure was obtained (3906 ± 22 mmHg compared to 3120 ± 347 mmHg for pristine scaffolds). Scaffolds treated at higher pH conditions showed similar burst pressure measurements, close to the ones of the control scaffolds (2919 ± 312 mmHg at pH 12 and 2443 ± 249 mmHg at pH 12.25).

4.8 Discussion

In the route of designing efficient vascular grafts for the replacement of small diameter arteries, biomechanics and biocompatibility are two of the major concerns. Most related challenges can be addressed by the use of synthetic polymers such as polyethylene terephthalate (PET) when scaffolds are properly designed. Additional biofunctionalization steps of the PET structures have been proposed in order to get specific and beneficial interactions between the graft and the biological environment. However, PET is an inert polymer and lacks active functional groups on the surface to attach biomolecules such as proteins (Bui et al., 1993; Muthuvijayan et al., 2009; Nissen et al., 2008).

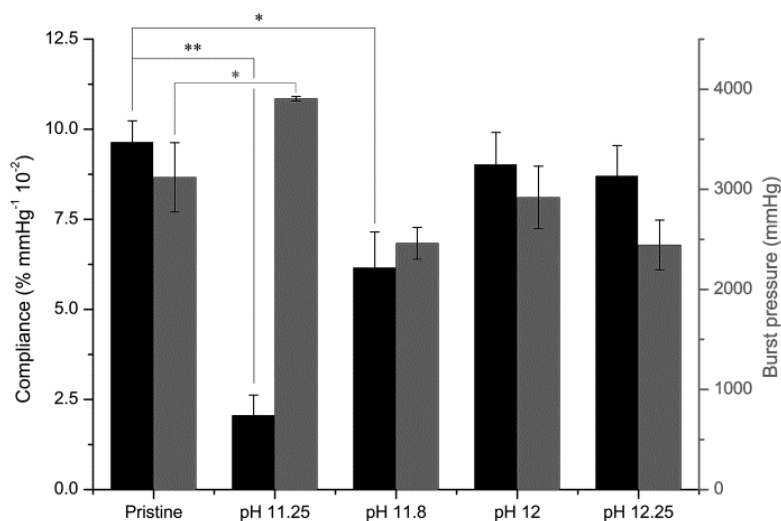


Figure 4-7 : Mechanical properties of PVAm-treated tubular scaffolds. Compliance under physiological conditions (black columns) and burst pressure (gray columns) were measured as described in the Materials and Methods section ($n = 3$) on PET scaffolds treated with PVAm at different pH conditions. Bonferroni-ANOVA was performed for both compliance and burst pressure (* means $p < 0.05$ and ** means $p < 0.005$).

As a first step in the development of biofunctionalized PET grafts, PET amination is an attractive way to get versatile reactive moieties for subsequent grafting. However, when such a chemical modification is conducted, the original biomechanical properties of the pristine PET scaffold are in jeopardy. The commonly used method for PET amination is based on aminolysis with small diamine molecules, such as ethylenediamine (EtDA) (Bech et al., 2007; Irena et al., 2009). This convenient technique can efficiently introduce amino groups on PET surfaces, although it presents some limitations in terms of PET degradation, (*e.g.* low mechanical properties, large weight loss, etc.) (Avny & Rebenfeld, 1986; Bech et al., 2007; Ellison et al., 1982; Fukatsu, 1992; Irena et al., 2009; Muthuvijayan et al., 2009; Noel et al., 2011). As already highlighted by Avny et al. (Avny & Rebenfeld, 1986), the use of long diamines should lead to less damage than commonly used short aminated molecules. High molecular weight could indeed prevent diffusion into the bulk material, thus limiting the modifications to the outer surface. In this study, we present a new method for PET functionalization with amino groups using a high molecular weight multi-aminated polymer, namely polyvinylamine (PVAm). Such a macromolecule is expected to bring more amino groups on the surface for a lower extent of the damaging chain-scission reaction. To assess the potential of PVAm for PET amination, an extensive study was conducted by characterizing both

aminolysis rate and mechanical properties of modified PET structures, which were initially designed for vascular grafting purposes.(Moreno et al., 2011)

The aminolysis reaction is based on a nucleophilic attack at the carbonyl site of PET by the unprotonated amino groups of PVAm (Figure 4-2-A). As PVAm is initially cationic (PVAm·HCl), alkaline conditions are required to deprotonate its amine functionalities. As a non-toxic and water-soluble compound, NaOH was selected to adjust the pH (Dimitrievska et al., 2011), despite its well-known side reaction with PET, namely hydrolysis. To conduct a thorough analysis, common EtDA-based aminolysis and hydrolysis were carried out to make comparative studies on PET planar mats.

The PVAm-based aminolysis was observed to be favored in alkaline conditions (Figure 4-3). The higher the pH, the more unprotonated amino groups per PVAm chain could indeed react with PET ester links. Therefore, the grafting was expected to be directly related to the pK_a of PVAm, as already reported for small molecules (Croll, O'Connor, Stevens, & Cooper-White, 2004). However, besides the unexpectedly steep slope, the observed threshold pH is rather high (ca. 11.7, Figure 4-3) compared to the expected pK_a of PVAm chains (8.5 – 10.0) (Katchalsky, Mazur, & Spitnik, 1957; Renken & Hunkeler, 2007; Sumaru, Matsuoka, & Yamaoka, 1996), even if dioxane addition could have slightly altered the pH of the mixture (Rosés, 2004). More likely, the observed threshold may be related to electrostatic repulsions becoming negligible as pH increases rather than being directly equal to the pK_a value. Such a drastic modification of the aminolysis reaction rate was already observed in solution (Castro, Echevarría, Opazo, Robert, & Santos, 2006). The authors hypothesized a conformational change of the polyelectrolyte when the intramolecular electrostatic repulsions lessened. More significantly, intermolecular repulsions between grafted and free PVAm chains could have prevented the latter from reacting with the PET mat due to its surface charge.

The strong alkaline conditions needed for PVAm to substantially react with PET, also catalyzed a PET hydrolysis reaction that is known to damage polyesters chains (Figure 4-2-B) (Ellison et al., 1982; Liu et al., 2005). Therefore, the mechanical properties of our PVAm-aminolysed PET mats were compared to those of hydrolysed PET mats in order to evaluate the contribution of both lyses reactions to PET degradation. The mechanical properties of both PVAm-aminolysed and NaOH-hydrolysed PET mats (Figure 4-4-A) were found to follow the same trend, highly suggesting that hydrolysis is the only damaging reaction occurring during the PVAm treatment. Of salient interest,

PVAm-treated PET mats always displayed mechanical properties that were higher than those of hydrolyzed mats, indicating a beneficial role of the PVAm grafting. That behavior can mostly be explained by the competition occurring between aminolysis and hydrolysis reactions that both target the ester bonds of PET (Croll et al., 2004). Such a beneficial effect of PVAm may also originate from the creation of multiple amide bonds per PVAm molecule, as already suggested by Bui *et al.* in the case of diaminopropane grafting (Bui et al., 1993). Links could indeed have been formed between PET fibers, thus strengthening the overall PET structure. Interestingly, even at a pH as high as 12.25, PVAm-covered mats did not display any sign of erosion when visualized by SEM. This starkly contrasts with the obvious pitting observed for hydrolyzed mats at the same pH (Figure 4-4, compare B and C). A comparison to another amination treatment was essential to efficiently assess the potential of our new process. In that endeavor, the PVAm treatment was compared to one of its alternative using a small diamine, namely ethylenediamine (EtDA), as a reference treatment. Reaction conditions already validated for subsequent successful biofunctionalization of PET substrates (Bech et al., 2007) were used to assess whether the amine densities resulting from our PVAm treatment were sufficient enough. Amino group densities were found to be in the same range for both aminolyses reactions (compare Figure 4-5 and Figure 4-3), both disclosing the efficiency of our amination process and allowing a legitimate comparison of the aminated PET structures in terms of degradation and mechanical properties. A drastic difference was found between mechanical properties for EtDA- and PVAm-treated mats (Figure 4-6-A). For the lowest amino group densities (ca. 6 $\mu\text{mol/g}$, for PVAm grafting conducted at pH 11.25 and 30% v/v EtDA grafting), EtDA-treated mats were already strongly damaged compared to their PVAm-treated counterparts. That was evidenced quantitatively by their much lower mechanical properties at any amino group density (Figure 4-6-A), as well as qualitatively, as one can judge in Figure 4-6 (compare B and C). EtDA-aminolysis is indeed reported to be even more damaging than hydrolysis, because small diamine molecules can diffuse into the bulk whereas hydrolysis is known to occur mostly on the surface (Avny & Rebenfeld, 1986; Ellison et al., 1982). Such a bulk reaction could explain why EtDA-treated mats were that much damaged compared to PVAm-treated mats. Altogether, our comparative studies on PET planar mats showed that PVAm treatment could yield high amino group densities while mostly saving their initial elastic mechanical properties, unlike commonly used amination treatments. Of interest, L-cysteine was grafted onto those moieties thanks to a crosslinker as an example of subsequent bioconjugation

(Gappa-Fahlenkamp, Duan, & Lewis, 2004; Muthuvijayan et al., 2009). The high grafting yield obtained (ca. 70%) supported the availability and the reactivity of the amino groups for subsequent biofunctionalization.

Regarding the mechanical aspects, the main modifications induced by PVAm treatment (as well as hydrolysis treatment) on PET planar mats were observed beyond the elastic domain, i.e. for the strain at maximum load rather than for the strength at yield (showing significant but yet slight loss above pH 11.9). The latter is believed to be of greater importance as vascular grafts are supposed to be used only within the elastic domain. However, to our knowledge, relevant mechanical properties of tubular scaffolds, such as compliance and burst pressure, could not be directly derived from uniaxial tensile testing (Stewart & Lyman, 1990). Hence, the promising PVAm treatment was then applied to our 6-mm wide compliant PET tubular scaffolds (Table 1), as a first step in the development of performing biofunctionalized vascular grafts.

Interestingly, the PVAm-based amination treatment proved to be suitable for both geometries, namely planar and tubular (Figure 4-3). Of huge interest, for pH conditions yielding high amino group densities (i.e. pH 12 and pH 12.25), the compliance of pristine scaffolds was preserved up to 90% (Figure 4-7). Corresponding burst pressures were slightly lower than the one of pristine scaffolds, but not in a significant manner ($p > 0.05$).

A peculiar mechanical behavior was observed for PET scaffolds treated at low pH (see pH 11.25 on Figure 4-7), i.e. leading to significantly low compliance (ca. 20% of the original compliance) and significantly high burst pressure (ca. 125% of the original burst pressure). Such results were not expected from the previous 90°-tensile testing on PVAm-treated planar mats, for which the strength at yield was hardly modified regardless of the pH (Figure 4-4-A). That atypical behavior of PET tubular scaffolds was consistent with a strengthening of the structures and supported our previously mentioned hypothesis that multiple covalent bonds could be formed between PVAm chains and PET fibers. Besides, that phenomenon could indeed be favored at low pH due to electrostatic attractions and repulsions taking place at the PET surface: positively charged grafted PVAm chains might be attracted to the slightly hydrolyzed PET surface, while keeping free PVAm chains away from the surface. That web-like PVAm anchoring on PET fibers is consistent with the low amino group densities observed at low pH. At higher pH, i.e. above the pH threshold (ca. 11.7), electrostatic interactions are negligible and PVAm chains most probably form only few covalent

bonds with the PET structures. Such PVAm tails being exposed to the outer environment is consistent with the high amino group densities observed at high pH and with the unchanged mechanical properties.

Altogether, our 6-mm wide PVAm-treated PET scaffolds showed a compliance ($8.69 \pm 0.5\% \cdot 10^{-2} \text{ mmHg}^{-1}$ for pH 12.25-treated scaffolds) way closer to the one of arteries ($8.5 \pm 2.8\% \cdot 10^{-2} \text{ mmHg}^{-1}$) than any of the commercial grafts (ca. less than $2\% \cdot 10^{-2} \text{ mmHg}^{-1}$) (Moreno et al., 2011; Salacinski et al., 2001; Tai et al., 2000). Besides, their relatively high burst pressure ($2443 \pm 249 \text{ mmHg}$) compared to average systolic pressure (120 mmHg) makes them extremely promising for use as artery substitutes. Addressing the thrombogenicity issues by allowing reendothelialization on such compliant structures can now get underway thanks to further bionconjugation on the many available amino groups provided by PVAm.

4.9 Conclusions

This study presents an amination method for functionalization of PET structures. The use of PVAm as a main reagent proved to be efficient to get reactive moieties on different PET structures while saving their key mechanical properties. The method was successfully applied to PET tubular scaffolds designed as small diameter vascular grafts. The compliance match between those scaffolds and native arteries was mostly preserved after the treatment in selected conditions. Consequently, such a technique paves the way for the design of biofunctionalized compliant vascular substitutes, which are suitable for the challenging replacement of small arteries.

4.10 Acknowledgments

This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Council of Canada (NSERC) and the Canada Research Chair Protein-enhanced Biomaterials (G.D.C.). The authors would also like to thank Manon Plourde, Karine Théberge, François Vachon and Nathalie Raymond for their help or advice during the conduction of this experimental work.

4.11 Notes

^a Department of Chemical Engineering, Groupe de Recherche en Sciences et Technologies Biomédicales, Bio-P² Research Unit, École Polytechnique de Montréal, P.O. Box 6079, succ. Centre-Ville, Montréal (QC), Canada H3C 3A7.

^b National Research Council Canada, Ottawa (ON), Canada K1A 0R6.

^c National Research Council Canada, Boucherville (QC), Canada J4B 6Y4.

* E-mail: gregory.decrescenzo@polymtl.ca; Tel: (514) 340-4711 (#7428); Fax: (514) 340-2990.

4.12 References

Avny, Y., & Rebenfeld, L. (1986). Chemical modification of polyester fiber surfaces by amination reactions with multifunctional amines. *Journal of Applied Polymer Science*, 32(3), 4009-4025. doi: 10.1002/app.1986.070320318

Bech, L., Meylheuc, T., Lepoittevin, B., & Roger, P. (2007). Chemical surface modification of poly(ethylene terephthalate) fibers by aminolysis and grafting of carbohydrates. *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry*, 45(11), 2172-2183. doi: 10.1002/Pola.21983

Bide, M., Phaneuf, M., Brown, P., McGonigle, G., & LoGerfo, F. (2006). Modification of polyester for medical uses. In J. V. Edwards, G. Buschle-Diller, & S. C. Goheen (Eds.), *Modified fibers with medical and specialty applications* (pp. 91-124): Springer Netherlands.

Boucher, C., Liberelle, B., Jolicoeur, M., Durocher, Y., & De Crescenzo, G. (2009). Epidermal growth factor tethered through coiled-coil interactions induces cell surface receptor phosphorylation. *Bioconjugate Chemistry*, 20(8), 1569-1577. doi: 10.1021/bc9001147

Bui, L. N., Thompson, M., McKeown, N. B., Romaschin, A. D., & Kalman, P. G. (1993). Surface modification of the biomedical polymer poly(ethylene terephthalate). *Analyst*, 118(5), 463-474.

Bureau, M. N., Maire, M., Diaz-Quijada, G., Robitaille, L., Ajji, A., & Merhi, Y. (2009). Nonwoven PET fiber structures for vascular graft applications. Paper presented at the 67th Annual Technical Conference of the Society of Plastics Engineers, Brookfield, CT, USA.

- Castro, E. A., Echevarría, G. R., Opazo, A., Robert, P. S., & Santos, J. G. (2006). Kinetics and mechanism of the reactions of polyallylamine with aryl acetates and aryl methyl carbonates. *Journal of Physical Organic Chemistry*, 19(2), 129-135. doi: 10.1002/poc.1007
- Chen, W., & McCarthy, T. J. (1998). Chemical surface modification of poly(ethylene terephthalate). *Macromolecules*, 31(11), 3648-3655. doi: 10.1021/Ma9710601
- Chollet, C., Chanseau, C., Brouillaud, B., & Durrieu, M. C. (2007). RGD peptides grafting onto poly(ethylene terephthalate) with well controlled densities. *Biomolecular Engineering*, 24(5), 477-482. doi: 10.1016/j.bioeng.2007.07.012
- Croll, T. I., O'Connor, A. J., Stevens, G. W., & Cooper-White, J. J. (2004). Controllable surface modification of poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) by hydrolysis or aminolysis I: physical, chemical, and theoretical aspects. *Biomacromolecules*, 5(2), 463-473. doi: 10.1021/bm0343040
- Desmet, T., Morent, R., De Geyter, N., Leys, C., Schacht, E., & Dubruel, P. (2009). Nonthermal plasma technology as a versatile strategy for polymeric biomaterials surface modification: A review. *Biomacromolecules*, 10(9), 2351-2378. doi: 10.1021/bm900186s
- Devine, C., & McCollum, C. (2004). Heparin-bonded Dacron or polytetrafluorethylene for femoropopliteal bypass: five-year results of a prospective randomized multicenter clinical trial. *Journal of Vascular Surgery*, 40(5), 924-931. doi: 10.1016/j.jvs.2004.08.033
- Dimitrievska, S., Maire, M., Diaz-Quijada, G. A., Robitaille, L., Ajji, A., Yahia, L., . . . Bureau, M. N. (2011). Low thrombogenicity coating of nonwoven PET fiber structures for vascular grafts. *Macromolecular Bioscience*, 11(4), 493-502. doi: 10.1002/mabi.201000390
- Ellison, M. S., Fisher, L. D., Alger, K. W., & Zeronian, S. H. (1982). Physical properties of polyester fibers degraded by aminolysis and by alkaline hydrolysis. *Journal of Applied Polymer Science*, 27(1), 247-257. doi: 10.1002/app.1982.070270126
- Fukatsu, K. (1992). Mechanical properties of poly(ethylene terephthalate) fibers imparted hydrophilicity with aminolysis. *Journal of Applied Polymer Science*, 45(11), 2037-2042. doi: 10.1002/app.1992.070451118
- Gappa-Fahlenkamp, H., Duan, X., & Lewis, R. S. (2004). Analysis of immobilized L-cysteine on polymers. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 71A(3), 519-527. doi: 10.1002/jbm.a.30180

- Goddard, J. M., & Hotchkiss, J. H. (2007). Polymer surface modification for the attachment of bioactive compounds. *Progress in Polymer Science*, 32(7), 698-725. doi: 10.1016/j.progpolymsci.2007.04.002
- Gupta, B., Plummer, C., Bisson, I., Frey, P., & Hilborn, J. (2002). Plasma-induced graft polymerization of acrylic acid onto poly(ethylene terephthalate) films: characterization and human smooth muscle cell growth on grafted films. *Biomaterials*, 23(3), 863-871. doi: 10.1016/s0142-9612(01)00195-8
- Hu, J., Yin, C., Mao, H. Q., Tamada, K., & Knoll, W. (2003). Functionalization of poly(ethylene terephthalate) film by pulsed plasma deposition of maleic anhydride. *Advanced Functional Materials*, 13(9), 692-697. doi: 10.1002/adfm.200304384
- Inoue, S., Imamura, M., Hirano, Y., & Tabata, Y. (2009). Adhesion and Proliferation of Human Adipo-Stromal Cells for Two- or Three-Dimensional Poly(ethylene terephthalate) Substrates with or without RGD Immobilization. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 20, 721-736. doi: 10.1163/156856209x426600
- Irena, G., Jolanta, B., & Karolina, Z. (2009). Chemical modification of poly(ethylene terephthalate) and immobilization of the selected enzymes on the modified film. *Applied Surface Science*, 255(19), 8293-8298. doi: 10.1016/j.apsusc.2009.05.126
- Ito, Y. (2008). Covalently immobilized biosignal molecule materials for tissue engineering. *Soft Matter*, 4(1), 46-56. doi: 10.1039/b708359a
- Jiao, Y.-P., & Cui, F.-Z. (2007). Surface modification of polyester biomaterials for tissue engineering. *Biomedical Materials*, 2(4), R24-R37. doi: 10.1088/1748-6041/2/4/r02
- Katchalsky, A., Mazur, J., & Spitnik, P. (1957). SECTION II: Polybase properties of polyvinylamine. *Journal of Polymer Science*, 23(104), 513-532. doi: 10.1002/pol.1957.1202310401
- Konig, G., McAllister, T. N., Dusserre, N., Garrido, S. A., Iyican, C., Marini, A., . . . L'Heureux, N. (2009). Mechanical properties of completely autologous human tissue engineered blood vessels compared to human saphenous vein and mammary artery. *Biomaterials*, 30(8), 1542-1550. doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.11.011

- L'Heureux, N., Dusserre, N., Konig, G., Victor, B., Keire, P., Wight, T. N., . . . McAllister, T. N. (2006). Human tissue-engineered blood vessels for adult arterial revascularization. *Nature Medicine*, 12(3), 361-365. doi: 10.1038/nm1364
- Liu, Y. X., He, T., & Gao, C. Y. (2005). Surface modification of poly(ethylene terephthalate) via hydrolysis and layer-by-layer assembly of chitosan and chondroitin sulfate to construct cytocompatible layer for human endothelial cells. *Colloids and Surfaces, B: Biointerfaces*, 46(2), 117-126. doi: 10.1016/j.colsurfb.2005.09.005
- Ma, Z. W., Mao, Z. W., & Gao, C. Y. (2007). Surface modification and property analysis of biomedical polymers used for tissue engineering. *Colloids and Surfaces, B: Biointerfaces*, 60(2), 137-157. doi: 10.1016/j.colsurfb.2007.06.019
- Marchand-Brynaert, J., Deldime, M., Dupont, I., Dewez, J. L., & Schneider, Y. J. (1995). Surface functionalization of poly(ethylene terephthalate) film and membrane by controlled wet chemistry: Chemical characterization of carboxylated surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science*, 173(1), 236-244. doi: 10.1006/jcis.1995.1319
- Moreno, M. J., Ajji, A., Mohebbi-Kalhor, D., Rukhlova, M., Hadjizadeh, A., & Bureau, M. N. (2011). Development of a compliant and cytocompatible micro-fibrous polyethylene terephthalate vascular scaffold. *Journal of Biomedical Materials Research, Part B: Applied Biomaterials*, 97B(2), 201-214. doi: 10.1002/jbm.b.31774
- Muthuvijayan, V., Gu, J., & Lewis, R. S. (2009). Analysis of functionalized polyethylene terephthalate with immobilized NTPDase and cysteine. *Acta Biomaterialia*, 5(9), 3382-3393. doi: 10.1016/j.actbio.2009.05.020
- Nissen, K. E., Stuart, B. H., Stevens, M. G., & Baker, A. T. (2008). Characterization of aminated poly(ethylene terephthalate) surfaces for biomedical applications. *Journal of Applied Polymer Science*, 107(4), 2394-2403. doi:10.1002/app.27145
- Noel, S., Liberelle, B., Robitaille, L., & De Crescenzo, G. (2011). Quantification of primary amine groups available for subsequent biofunctionalization of polymer surfaces. *Bioconjugate Chemistry*, 22(8), 1690-1699. doi: 10.1021/bc200259c
- Öteyaka, M., Chevallier, P., Turgeon, S., Robitaille, L., & Laroche, G. (2012). Low Pressure Radio Frequency Ammonia Plasma Surface Modification on Poly(ethylene terephthalate) Films and

Fibers: Effect of the Polymer Forming Process. *Plasma Chemistry and Plasma Processing*, 32(1), 17-33. doi: 10.1007/s11090-011-9330-3

Renken, A., & Hunkeler, D. (2007). Polyvinylamine-based capsules: A mechanistic study of the formation using alginate and cellulose sulphate. *Journal of Microencapsulation*, 24(4), 323-336. doi: 10.1080/02652040601162350

Roger, V. L., Go, A. S., Lloyd-Jones, D. M., Adams, R. J., Berry, J. D., Brown, T. M., . . . Wylie-Rosett, J. (2011). Heart disease and stroke statistics - 2011 update: A report from the american heart association. *Circulation*, 123(4), e18-209. doi: 10.1161/CIR.0b013e3182009701

Rosés, M. (2004). Determination of the pH of binary mobile phases for reversed-phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1037(1-2), 283-298. doi: 10.1016/j.chroma.2003.12.063

Salacinski, H. J., Goldner, S., Giudiceandrea, A., Hamilton, G., Seifalian, A. M., Edwards, A., & Carson, R. J. (2001). The mechanical behavior of vascular grafts: A review. *Journal of Biomaterials Applications*, 15(3), 241-278. doi: 10.1106/na5t-j57a-jtdd-fd04

Schröder, K., Meyer-Plath, A., Keller, D., Besch, W., Babucke, G., & Ohl, A. (2001). Plasma-induced surface functionalization of polymeric biomaterials in ammonia plasma. *Contributions to Plasma Physics*, 41(6), 562-572. doi: 10.1002/1521-3986(200111)41:6<562::aid-ctpp562>3.0.co;2-y

Seifalian, A. M., Tiwari, A., Hamilton, G., & Salacinski, H. J. (2002). Improving the clinical patency of prosthetic vascular and coronary bypass grafts: The role of seeding and tissue engineering. *Artificial Organs*, 26(4), 307-320. doi: 10.1046/j.1525-1594.2002.06841.x

Siow, K. S., Britcher, L., Kumar, S., & Griesser, H. J. (2006). Plasma methods for the generation of chemically reactive surfaces for biomolecule immobilization and cell colonization: A review. *Plasma Processes and Polymers*, 3(6-7), 392-418. doi: 10.1002/ppap.200600021

Stewart, S. F. C., & Lyman, D. J. (1990). Predicting the compliance of small diameter vascular grafts from uniaxial tensile tests. *Journal of Biomechanics*, 23(7), 629-637. doi: 10.1016/0021-9290(90)90162-v

- Sumaru, K., Matsuoka, H., & Yamaoka, H. (1996). Exact evaluation of characteristic protonation of poly(vinylamine) in aqueous solution. *Journal of Physical Chemistry*, 100(21), 9000-9005. doi: 10.1021/jp953385u
- Tai, N. R., Salacinski, H. J., Edwards, A., Hamilton, G., & Seifalian, A. M. (2000). Compliance properties of conduits used in vascular reconstruction. *British Journal of Surgery*, 87(11), 1516-1524. doi: 10.1046/j.1365-2168.2000.01566.x
- Tiwari, A., Salacinski, H. J., Hamilton, G., & Seifalian, A. M. (2001). Tissue engineering of vascular bypass grafts: Role of endothelial cell extraction. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*, 21(3), 193-201. doi: 10.1053/ejvs.2001.1316
- Ventre, M., Netti, P. A., Urciuolo, F., & Ambrosio, L. (2009). Soft tissues characteristics and strategies for their replacement and regeneration. In M. Santin (Ed.), *Strategies in Regenerative Medicine* (pp. 1-40). New York: Springer.

CHAPITRE 5 ARTICLE 2 – DEVELOPMENT OF A POLYESTER COATING COMBINING ANTI-THROMBOGENIC AND CELL ADHESIVE PROPERTIES – INFLUENCE OF SEQUENCE AND D SURFACE DENSITY OF ADHESION PEPTIDES

Développement d'un revêtement de polyester anti-thrombogène et permettant l'adhésion cellulaire

Cet article adresse l'objectif 2 : « Développer un revêtement permettant à la fois l'adhésion de cellules endothéliales et la résistance à l'adhésion de plaquettes. » en se basant sur les hypothèses suivantes :

- Hypothèse 2 : L'utilisation d'un espaceur à base de polyéthylène glycol (PEG) permet d'assurer une faible thrombogénicité des surfaces et d'étudier spécifiquement le rôle des biomolécules greffées.
- Hypothèse 3 : Il existe un peptide permettant l'adhésion sélective des cellules endothéliales par rapport aux cellules musculaires lisses et aux plaquettes.
- Hypothèse 6 : La densité de peptides/protéines greffés a une influence importante sur les effets cellulaires observés et peut être optimisée.

5.1 Résumé

Diverses stratégies de biofonctionnalisation ont été développées pour améliorer les prothèses vasculaires de petit diamètre. Cependant, aucun revêtement n'est suffisamment efficace pour assurer l'endothélialisation tout en restant anti-thrombogène. Dans cet article, nous avons exploré la combinaison d'un agent anti-adhésif (*low-fouling*), le polyéthylène glycol (PEG), et des peptides d'adhésion RGD, YIGSR et REDV, tous greffés sur des films de PET recouverts de polyvinylamine (PVAm). La couche dense de PEG obtenue a permis le greffage subséquent de peptides sur une large gamme de densité (environ 20 à 2 000 pmol/cm²). Les performances du revêtement ont été évaluées en termes d'adhésion de cellules endothéliales (HUVEC), d'adhésion plaquettaire et d'adsorption de protéines. Toutes étaient initialement inhibées par la couche de PEG. Le peptide RGD présenta les propriétés adhésives attendues, tant pour les HUVEC que pour les plaquettes. REDV ne favorisa ni l'adhésion plaquettaire, tel qu'attendu, ni l'adhésion des

HUVEC, en contradiction avec d'autres études. Malgré une légère thrombogénicité, YIGSR s'avéra la séquence la plus prometteuse, et sera combinée à d'autres agents anti-thrombogènes dans de futurs travaux.

5.2 Header

DEVELOPMENT OF A POLYESTER COATING COMBINING ANTI-THROMBOGENIC AND CELL ADHESIVE PROPERTIES – INFLUENCE OF SEQUENCE AND SURFACE DENSITY OF ADHESION PEPTIDES

Samantha Noel[†], Ahmed Hachem[‡], Yahye Merhi[‡], Gregory De Crescenzo^{†,}.*

[†] Department of Chemical Engineering, Groupe de Recherche en Sciences et Technologies Biomédicales, Bio-P² Research Unit, École Polytechnique de Montréal, P.O. Box 6079, succ. Centre-Ville, Montréal (QC), Canada H3C 3A7

[‡] Université de Montréal, Montreal Heart Institute, 5000 Belanger Est, Montréal (QC), Canada H1T 1C8

5.3 Keywords.

Endothelialization; HUVEC; adhesive peptides; RGD; YIGSR; REDV; surface density; PEG linker; thrombogénicité; aminolysis; PVAm; PET.

5.4 Abstract

Biofunctionalization strategies have been developed to improve small-diameter vascular grafts. However, a fully successful coating featuring anti-thrombogenic properties while allowing for endothelialization has not been achieved yet. In this report, we explored the combination of low-fouling polyethylene glycol (PEG) and adhesion peptides, namely RGD, YIGSR, and REDV, grafted on top of polyvinylamine (PVAm)-coated polyester. The peptides were grafted over a wide range of density (about 20 to 2 000 pmol/cm²) on top of a dense PEG underlayer. The coating performances were assessed through HUVEC adhesion, platelet attachment and protein adsorption, which were all drastically diminished on PEG-coated samples. RGD exhibited the expected high

adhesive properties, towards both HUVEC and platelets. REDV had no effect neither on platelet attachment, as expected, nor on HUVEC adhesion, in contrast with previous reports. YIGSR was the most promising sequence even though its combination with other agents should be explored to further decrease thrombogenicity for vascular graft applications.

5.5 Introduction

In recent years, the biomaterials community has embraced the idea that implant fate is determined at the interface between the foreign material and its environment. Control over the biomaterial surface properties is therefore a key starting point that has been, and still is, sought by many groups including ours (Delaittre et al., 2012). Particularly, in the design of vascular conduits, fine-tuning the properties of the inner surface is essential, as the latter should mimic the endothelium as closely as possible. Considering the complexity of the endothelium functions (Nachman & Jaffe, 2004), this task mostly implies seeking for a complete endothelialization of the vascular graft. Complete endothelialization through endothelial cell (EC) seeding takes weeks of maturation to be achieved prior implantation, making it clinically impractical (Chlupáč et al., 2009; Seifu et al., 2013; Vara et al., 2005). Accordingly, recent reports had been focused on single-stage EC seeding (*ex situ*) without complete maturation or homing (*in situ*) of endothelial progenitor cells (EPCs) on adequately modified surfaces (Campbell & Campbell, 2007; de Mel et al., 2008; Pankajakshan & Agrawal, 2010; Seifu et al., 2013). Considering such strategies where the sought endothelium lining is either incomplete or inexistent at the implantation, graft interactions with blood components must be carefully looked at to prevent immunogenic response, thrombogenicity and intimal hyperplasia (Seifu et al., 2013). Altogether, relevant surface modification of the biomaterial must be carried out. First and foremost, the substrate has to be enriched with adhesive cues that will allow ECs (or EPCs) to quickly attach, spread and strongly adhere to resist disruptive forces such as blood shear stress. Prior to neo-endothelium completion, the designed surface modification should be specific enough to prevent adsorption of thrombogenic materials (proteins, platelets) as well as adhesion and subsequent proliferation of smooth muscle cells (SMCs) to avoid hyperplasia. Such a controlled and specific functionalization can only be achieved by the tethering of carefully chosen biomolecules (Rahmany & Van Dyke, 2013). This biofunctionalization generally relies on three simple questions: which molecules should be tethered to the surface? How to tether them? And what molecule density would provide the adequate EC adhesion strength?

Numbers of biomolecules have been isolated and grafted onto materials to mediate cell adhesion. Most of them are extracellular matrix (ECM) proteins (*e.g.* collagen, fibronectin, vitronectin, laminin) as well as peptides derived from them (de Mel et al., 2008; Delaittre et al., 2012). Compared to whole proteins, the use of peptides allows for higher control over the cell response as well as minimized immunogenicity, in addition to many advantages related to their synthesis, handling and grafting (Bellis, 2011; Collier & Segura, 2011). The tripeptide RGD is the main adhesive domain of many ECM proteins (*e.g.* fibronectin, vitronectin, fibrinogen) (Hersel et al., 2003). RGD has been effectively applied to enhance adhesion, spreading and migration of numerous cell lines onto various materials (Bellis, 2011; de Mel et al., 2008; Delaittre et al., 2012; Hersel et al., 2003; Rahmany & Van Dyke, 2013). As research on this motif was growing, RGD has been shown to interact with several different integrins, making it a non-specific cell adhesive peptide (Hersel et al., 2003; Humphries et al., 2006). More precisely, RGD acts through $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_5\beta_1$ and $\alpha_{IIb}\beta_3$ integrins that are present, if not abundant, on SMCs (Moiseeva, 2001; Pankajakshan & Agrawal, 2010) and platelets (Ni & Freedman, 2003). Considering that prevalence, new peptide sequences have emerged as EC-specific alternatives to RGD (de Mel et al., 2008), such as the REDV sequence from the CS-5 domain of fibronectin (Hubbell et al., 1991). REDV is reported to bind $\alpha_4\beta_1$ integrins, abundant on ECs while scarce on SMCs (Moiseeva, 2001; Plouffe, Radisic, & Murthy, 2008; Wei et al., 2011) as well as rare on platelets (de Mel et al., 2008; Ni & Freedman, 2003), making it a potential biomolecule of choice to functionalize vascular grafts. The YIGSR sequence from the B1 chain of laminin has also demonstrated some EC-specificity over platelets (Jun & West, 2005; Massia, Rao, & Hubbell, 1993), but its recognition by SMC surface receptors is still controversial (Avci-Adali et al., 2010; Fittkau et al., 2005; Hubbell et al., 1991).

Adhesion peptides can be covalently tethered to polymeric materials via different strategies (Goddard & Hotchkiss, 2007). The key to an efficient grafting is to expose the active sequence of the peptides away from the material so as to be available for cell interaction (Hersel et al., 2003; Shin et al., 2003). That is usually fulfilled by introducing a spacer molecule between the surface and the peptide. A few studies dealing with the influence of the spacer arm length reported that the minimal distance from the surface to the active peptide sequence being required for an effective integrin-mediated adhesion is a few nanometers (*e.g.* 3.5 nm (Hersel et al., 2003; Kantlehner et al., 1999), 12 glycine residues (Lee et al., 2010)). The spacer molecule (also called linker) provides a chemical bridge between the functional groups available on the biomaterial and on the peptides.

Conveniently, peptide sequences are chemically defined, allowing one to choose or add an amino acid with a unique moiety, absent from the active site of the peptide, to ensure a homogeneous spatial orientation of the biomolecules (Collier & Segura, 2011; Delaittre et al., 2012). Apart from its length and end-functionalities, the spacer arm itself can provide some additional properties to the surface. A recent review came to the conclusion that polyethylene glycol (PEG) would constitute an ideal spacer (Delaittre et al., 2012). Through its high chain mobility and low-fouling properties against platelets, proteins and cells (Dimitrievska et al., 2011; Michel et al., 2005; Thalla et al., 2014), a PEG linker could increase both the accessibility of the adhesion peptides to the cell integrins and the specificity of the adhesive coating (by masking the material surface). Despite those assets, only a few studies report the use of a PEG spacer for peptide adhesion grafting (Huang et al., 2009; Wei et al., 2011).

For a chosen grafting strategy, the surface density of adhesive motifs is of great importance (Hersel et al., 2003). Shin *et al.* reviewed the influence of peptides density and concluded that in most cases (i) there is a threshold in cellular response in the region of fmol/cm² to pmol/cm² depending on the surface and (ii) the maximal density is not always the most efficient one (Shin et al., 2003). Considerable behavioral changes in adhering cells have been reported even for narrow density ranges that were less than 1 order of magnitude (*e.g.* 60 – 240 pmol/cm² (Chollet et al., 2009) or 2.8 – 4.4 pmol/cm² (Lagunas et al., 2012)). Surprisingly, screenings of larger density ranges are very scarce. In 1991, Massia *et al.* reported an RGD range going from 10⁻⁶ pmol/cm² to 1 pmol/cm², showing a minimal density of 1 fmol/cm² for optimal cell response (Massia & Hubbell, 1991). More recently, Le Saux *et al.* reported a biphasic trend for RGD-mediated cell adhesion as a function of density starting from 10⁻⁷ to 100 pmol/cm², with an optimal density of 0.1 pmol/cm² (Le Saux et al., 2011). It is also worth noticing that dense RGD layers could lead to a too strong attachment force between the cells and the substrate, thereby hindering migration (Hersel et al., 2003; Palecek, Loftus, Ginsberg, Lauffenburger, & Horwitz, 1997). Further characterizing the spatial distribution of peptides, nano-patterning (*e.g.* nano-clustering (Maheshwari, Brown, Lauffenburger, Wells, & Griffith, 2000; Ventre et al., 2012)) as well as surface topography are also known to influence cell behavior (Delaittre et al., 2012; Rahmany & Van Dyke, 2013; Shin et al., 2003; Ventre et al., 2012).

In the present study, we developed a strategy for coating polyester materials with adhesion peptides, aiming at an efficient and specific EC coverage. Polyethylene terephthalate (PET) films

were used as a model since polyesters (*e.g.* PET (Moreno et al., 2011), PLA/PGA (Hibino et al., 2010), PCL (Nottelet et al., 2009)) are widely used for the design of synthetic vascular scaffolds (Seifu et al., 2013). The PET films were treated with polyvinylamine (PVAm), to enrich the surface with amino groups while maintaining the mechanical integrity of the material, as tested on nonwoven PET (Noel et al., 2013) and electrospun PLLA (unpublished results). Three cysteine-tagged adhesive peptides, namely RGD, YIGSR and REDV, were grafted onto our aminated PET surfaces *via* a 5-nm long PEG linker. The grafting strategy was thoroughly characterized and a large range of peptide densities, from about 20 to 2 000 pmol/cm², was explored. HUVEC adhesion, platelet attachment and protein adsorption were studied on those peptide-modified surfaces.

5.6 Materials and methods

5.6.1 Chemical and reagents

Milli-Q quality water (18.2 M Ω cm; total organic compounds (TOC) = 4 ppb) was generated with a Millipore Gradient A 10 purification system. Sodium hydroxide (NaOH, 99.3% purity), isopropyl alcohol (99.5% purity), dioxane (99+% purity), dimethylsulfoxide (DMSO, 99.9+% purity) and hydrochloric acid (HCl, 37.7% v/v) were obtained from VWR International, Ltd. (Mont-Royal, QC). Anhydrous ethylic alcohol (EtOH, 99.9% purity) was purchased from Comalc.

Orange II sodium salt (92% purity), cysteine (99+% purity), phosphate buffered saline (10 mM PBS, NaCl – 0.138 M, KCl – 0.027 M, pH 7.4) and potassium chloride (KCl, 99+% purity) were purchased from Sigma-Aldrich Canada, Ltd. (Oakville, ON). Ethylenediamine (EtDA, 99+% purity) was purchased from Fisher Scientific, Ltd. (Nepean, ON). The linear aminated polymer polyvinylamine (PVAm) was obtained from Poly-sciences, Inc. (Warrington, PA). 2-pyridyldithiol-tetraoxaocatriacontane-N-hydroxysuccinimide (PEG₁₂-SPDP, 95+% purity) was obtained from Pierce Biotechnology, Inc. (Rockford, IL). Ellman's reagent [5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid), DTNB] and ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) were purchased from Sigma-Aldrich Canada, Ltd. (Oakville, ON). D-Phenylalanyl-Prolyl-Arginyl Chloromethyl Ketone (PPACK) was purchased from Enzo Life Sciences (Brockville, ON).

Polyethylene terephthalate (PET) was obtained from Goodfellow as a 50 μ m-thick film which was cut into 1 cm-diameter disks for all described experiments.

5.6.2 Peptide grafting

5.6.2.1 Surface preparation.

All glassware was carefully cleaned by overnight immersion in a bath of KOH-saturated isopropyl alcohol, followed by intensive rinsing with Milli-Q water. The PET films were intensively rinsed in methanol and Milli-Q water and then dried in a laminar flow cabinet at room temperature (RT).

5.6.2.2 PET amination

PVAm grafting was performed on PET disks following a protocol adapted from a previous report (Noel et al., 2013). Briefly, PVAm·HCl (21.8 g.L⁻¹) was dissolved in a mix of NaOH and KCl (1:1, 272 mM in Milli-Q water) and the pH was adjusted to 12.5 by adding pure HCl. A mixture of the PVAm solution and dioxane (73:27 % v/v) was then prepared, leading to 200 mM of NH₂ moieties. Each PET film was immersed into 500 µL of that mixture, sonicated for 20 min and incubated for 24 h at 70°C.

The aminated films were characterized in terms of available amino group density by the Orange II assay (Noel et al., 2011). Briefly, the anionic dye was adsorbed onto the aminated films in acidic conditions and was subsequently released in basic conditions. The supernatant absorbance was measured at 484 nm and calibrated against known free Orange II concentrations.

5.6.2.3 PEG grafting

PVAm-modified PET disks were reacted with PEG₁₂-SPDP molecules. Briefly, a solution of 250 µM PEG₁₂-SPDP was prepared in PBS (2.5% v/v DMSO) supplemented with 5 M NaCl, unless mentioned otherwise. PET films were immersed in 500 µL of that solution for 90 min at 60°C. The disks were then rinsed by soaking them in DMSO, in 10 mM phosphate buffer (pH 7.4), and in Milli-Q water.

Samples were then either used for peptide grafting or for PEG grafting characterization. The latter was carried out through cysteine grafting and monitoring of concomitant release of 2-pyridinethiol groups, as previously reported (Noel et al., 2011). Briefly, PEG-grafted films were reacted with an excess of L-cysteine (50 mM) for 1 h at RT and the absorbance of the solution was measured at 343 nm. The latter was calibrated against known quantities of 2-pyridinethiol and a 1:1 stoichiometry was assumed for the reaction between PEG and cysteine.

5.6.2.4 CGG-peptides characterization

CGGRGD, CGGYIGSR and CGGREDV, as well as a mock CGGREVD, were synthesized at the peptide facility at the University of Colorado (> 98% purity). Each lyophilized peptide powder was dissolved at 1 mg/mL in 0.1 % acetic acid in Milli-Q water, aliquoted and stored at -80°C to prevent disulfide bond formation. Free thiols were quantified for each peptide thanks to Ellman's reagent (DTNB). Briefly, 60 µL of DTNB (1 mg/mL in PBS supplemented with EDTA 1 mM, named PBS-EDTA) were mixed with 140 µL of peptide solution (stock diluted either 35 or 70 times in PBS-EDTA) in a 96-well plate. 10 µL of Tween 20 (0.05% in PBS) were added to adjust the meniscus between peptide-containing wells and controls. Absorbance was read at 420 nm with a plate reader and values were calibrated against known concentration of L-cysteine (Tableau 5-1).

Tableau 5-1 : Description of cysteine-tagged peptides. Peptides were produced via solid phase synthesis and dissolved in slightly acidic aqueous medium. Free thiol concentration was measured thanks to Ellman's reagent as described in the material and methods section (n=4).

Peptide sequence	Charge at physiological pH ^a	Hydrophobicity (GRAVY) ^a	Stock concentration (µM)
CGGRGD	0	- 1.12	1057.8 ± 97.5
CGGYIGSR	+ 1	- 0.1	795.5 ± 38.9
CGGREDV	- 1	- 0.8	733.4 ± 52.8
CGGREVD (mock)	- 1	- 0.8	874.9 ± 39.0

^a Obtained from the ProtParam tool of ExPASy

5.6.2.5 CGG-peptides grafting

Each peptide of interest (RGD, YIGSR and REDV) was prepared as 20 µM solutions in PBS:EtOH (50% v/v of EtOH), which were mixed with a 20 µM solution of mock peptide (REVD) at the following v/v ratios : 100:0 (100%); 10:90 (10%) and 1:99 (1%). PEG-grafted PET disks were reacted with 500 µL of 20 µM peptide solutions for 20 h at RT. The reaction was performed in spectrophotometer cuvettes and the absorbance was monitored during the reaction, as previously described for cysteine grafting. The recorded curves were fitted to a kinetic model (equation (1)) using the *fminsearch* function in MATLAB (least mean squares).

$$\frac{dx}{dt} = k (A - x)(B - x)^2 \quad (1)$$

Where x is the measured absorbance, k is the kinetic constant (unknown), A is the initial concentration of peptides (20 μ M) converted to absorbance units, B is the total PEG density in equivalent absorbance units (unknown).

The peptide-grafted disks were then rinsed three times in PBS and three times in Milli-Q water and placed into 48-well polystyrene plates. For sterilization purposes, 500 μ L of EtOH (70% v/v in Milli-Q water) was added into each well for 20 min at RT, which were then rinsed with PBS. Until cell seeding, the disk-containing plate was filled with PBS and stored at 4°C for up to one day.

5.6.3 Cell adhesion

5.6.3.1 Cell culture

Cell culture was performed in a standard humidified incubator at 37°C with 5% CO₂. Primary human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were maintained in EBM-2 medium supplemented as recommended by the supplier (including 2% v/v fetal bovine serum (FBS), heparin, hydrocortisone, acid ascorbic, growth factors and antibiotics (30 μ g/ml gentamicin and 15 ng/ml amphotericin-B)). Medium was renewed every other day. For all tests, HUVECs were used between passages 3 and 5. Note that EBM-2 supplemented only with the antibiotics will be referred to as basal medium.

5.6.3.2 Cell seeding

Prior to cell seeding, PBS was removed from the previously prepared disk-containing plates, and a glass cylinder (inner diameter of 8 mm) was placed on top of each disk to prevent it from floating. HUVECs were seeded on each disk at 50 000 cells/cm² (equivalent to 80 000 cells/cm² if all cells stay inside the cylinder) in 250 μ L of complete medium. After a 1h adhesion period, the cylinders were removed and the substrates were washed once with PBS inside the wells and were further incubated in basal medium for 20 min at 37°C, to remove poorly adhered cells and proteins, as described by Zhu *et al.* (Zhu et al., 2001) Wells were then rinsed one more time with PBS and a resazurin assay was directly performed at that point.

5.6.3.3 Resazurin assay

Resazurin, the main component of Alamar blueTM (O'Brien, Wilson, Orton, & Pognan, 2000), was used to assess the metabolic activity of seeded cells. In this assay, resazurin is converted to

fluorescent resorufin by metabolically active cells. A resazurin solution was prepared by dissolving 100 $\mu\text{g/mL}$ in Milli-Q water and was aliquoted and stored at -20°C . The assay was performed as follows: after the last rinsing step, PBS was replaced with 250 μL of resazurin-supplemented complete medium (100 μL of resazurin solution for 10 mL of EGM-2) and the plate was placed in the incubator. Every 30 min, fluorescence was read in a plate reader with an excitation at 531/25 nm and emission filter at 595/60nm, and a slope in RFU/min was derived from those readings. After 2 hours of incubation with resazurin (four readings), cells were rinsed with PBS once and either further incubated in complete medium or fixed in formaldehyde (4% w/v in PBS) for 30 min at RT. Fixed cells were then rinsed once with PBS and disks were stored in PBS at RT. Note that resazurin is a non-toxic compound allowing for further culture and analysis of cells (Rampersad, 2012).

As disks could not be safely removed from wells prior to resazurin assay, a control was performed to determine how many cells adhered underneath the disks at the bottom of the wells. Briefly, a group of pristine PET films were removed from wells right after the rinsing steps and the resazurin assay was also performed on those empty wells. The resulting slope value (ca. 200 RFU/min) was subtracted from all others for each test.

5.6.3.4 Cell fluorescent imaging

Vinculin immunostaining as well as F-actin and nuclei staining were performed on HUVEC-covered functionalized PET disks. First, fixed cells were permeabilized with 250 μL of Triton X-100 (0.4 % v/v in PBS) for 10 min at RT, and blocked with BSA (1% in PBS) for 1h, to prevent further non-specific adsorption of antibodies. Disks were then carefully removed from wells with a scalpel and placed on top of a piece of parafilm, acting as a hydrophobic sublayer. Then, 50 μL of primary antibody solution (mouse anti-vinculin, 1:400 v/v in BSA 1%) were deposited on top of each disk that was incubated overnight at 4°C . After three PBS rinsing, 50 μL of secondary antibody solution (Alexa Fluor 546 goat anti-mouse, 1:400 v/v in BSA 1%) were deposited on top of each disk that was incubated for 1h at RT in the dark. After rinsing thrice with PBS, actin fibers were stained by depositing 50 μL of Alexa Fluor 488 phalloidin (1:80 v/v in PBS) on top of each disk that was incubated for 1h at RT in the dark. Ten minutes before the end, 5 μL of DAPI (20 $\mu\text{g/mL}$ in PBS) were carefully added to the 50 μL to stain the nuclei. Disks were then soaked three times in PBS and placed onto microscope slides. Five microliters of mounting medium (Dabco 4

mg/mL in glycerol:PBS 90:10 v/v) were deposited on top of each surface before placing the cover slip ($n^{\circ}1.5$) and sealing it with nail varnish.

Slides were then observed using an AX10 Imager from Carl Zeiss Microscopy (Peabody, MA) under 365, 470 and 555 nm excitations for DAPI, Alexa Fluor 488 and 546, respectively. Five images at 20 \times and 2 images at 63 \times were taken per sample. Min/max correction was performed for each channel before analyzing the images. For all 20 \times images, the CellProfiler software was used to identify primary (nuclei with a diameter between 5 and 25 μ m) and secondary (whole cells) objects, using the MCT and Otsu thresholding methods, respectively.

5.6.4 Platelet attachment

5.6.4.1 Platelet seeding

Venous blood was drawn from healthy volunteers, free from medication known to interfere with platelet function for at least 20 days before the experiment. The protocol was approved by the human ethical committee of the Montreal Heart Institute in accordance with the declaration of Helsinki for experiments involving humans. Five hundred microliters of fresh human blood supplemented with anticoagulant (PPACK, 53 nM) were added in each disk-containing wells of the previously prepared plates. The blood-filled plate was then slightly agitated for 30 min at RT. Disks were then rinsed with PBS and placed on top of a piece of parafilm for further immunostaining.

5.6.4.2 Platelet fluorescent imaging

Fifty microliters of antibody (Alexa Fluor 647 anti-CD61, 15 μ g/mL in BSA 1%) were deposited on top of each disk that was incubated for 30 min at RT in the dark. Disks were then soaked in PBS and placed back on top of a parafilm layer. Fifty microliters of formaldehyde 1% were deposited on top of each disk and was allowed to fix the stained platelets for 30 min at RT in the dark. Disks were then soaked in PBS and placed on microscope slides. Ten microliters of mounting medium (Dabco 4 mg/mL in glycerol:PBS 90:10 v/v) were deposited on top of each surface before placing the cover slip ($n^{\circ}1.5$) and sealing it with nail varnish.

Slides were then observed under a 633-nm excitation using a LSM-510 confocal microscope (Carl Zeiss). Three images at 20 \times were taken per sample and the CellProfiler software was used to

identify primary objects (free and micro-aggregated platelets with a diameter between 2.75 and 27.5 μm) using the MCT thresholding method.

5.6.5 XPS characterization of protein adsorption

Peptide-functionalized disks were placed on top of a piece of parafilm and 50 μL of protein mix was deposited onto them. The mix consisted either of FBS (from the EGM-2 medium kit) or plasma from human (pooled, in 3.8% trisodium citrate, obtained from Sigma-Aldrich Canada, Ltd. (Oakville, ON)). Both FBS and plasma were used as 10% v/v solution in PBS, and PBS alone was used as a control. Protein mixes were allowed to adsorb for 3 hours in a standard incubator. Disks were then rinsed in PBS and further incubated with 100 μL of PBS for 30 min to remove poorly attached proteins. The films were then rinsed in Milli-Q water and characterized by X-ray photoelectron spectroscopy (XPS).

Functionalized PET surfaces were characterized with respect to their elemental chemical compositions (in at. %) by XPS analyses (two surveys per sample). XPS spectra were obtained using a VG ESCALAB 3MkII instrument using non-monochromatic Mg K R radiation (12 kV, 18 mA). None of the samples exhibited any evidence of X-ray-induced damage during room-temperature XPS measurements. XPS spectra were acquired at 0° emission angle, normal to the sample surface, and possible charging was corrected by referencing all peaks to the carbon (C 1s) peak at binding energy $\text{BE} = 284.7 \text{ eV}$ in accordance with the literature. Quantification of the constituent elements was performed using broad-scan spectra and Avantage v4.12 software (Thermo Electron Corp., Waltham, MA) by integrating the areas under relevant peaks after a Shirley-type background subtraction, and using sensitivity factors from Wagner table.

5.6.6 Statistical analysis

When three or more independent experiments were performed ($N \geq 3$), data are represented as means and standard deviations of the means derived from the N repeated experiments, each performed in n replicates. Otherwise ($N < 3$), all samples were used ($n \times N$) to calculate means and standard deviations.

When mentioned in the corresponding figure captions, one-way analysis of variance (ANOVA) was performed and a Bonferroni *post-hoc* test was used to identify significant mean differences at a 95% confidence level.

5.7 Results

5.7.1 Peptide functionalization strategy

5.7.1.1 PET amination

Polyvinylamine (PVAm) was grafted onto PET films following an aminolysis reaction, as previously described (Noel et al., 2013). That reaction is based on a nucleophilic attack at the carbonyl site of PET by the unprotonated amino groups of PVAm. That treatment was shown to be non-damaging, despite the alkaline conditions (Noel et al., 2013). The grafting of PVAm was confirmed by the presence of the nitrogen element in the XPS survey (4.8 at. %), as characterized with more details in a previous study (Noel et al., 2011). The resulting amino group density was determined to be of $69.5 \pm 7.1 \times 10^2$ pmol/cm² through an Orange II assay. Those available amino groups were used for subsequent grafting steps.

5.7.1.2 PEG grafting

The PEG molecule used in this study was composed of an NHS group at one end, 12 PEG units and a *ortho*-pyridyldisulfide (*o*PSS) group at its other end. Such a heterobifunctional molecule was able to create a link between the available amino groups of the PVAm-grafted PET films – via its NHS group – and free thiol-containing molecules – via the *o*PSS group (Figure 5-1). This reaction induces the release of an aromatic group (2-pyridinethiol) in solution, which allowed for PEG quantification by absorbance when reacted with an excess of cysteine.

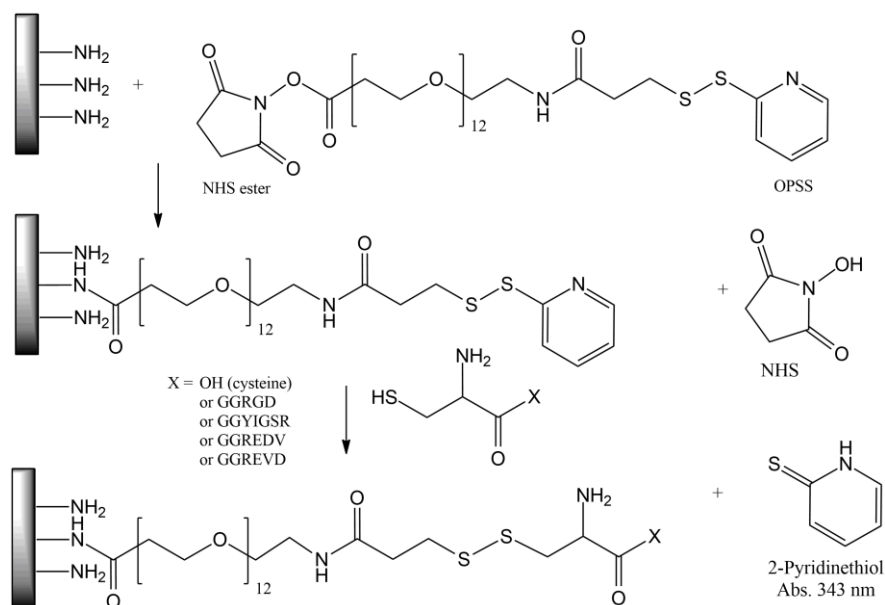


Figure 5-1 : Reaction scheme between aminated PET films, NHS-PEG12-PDP and cysteine-tagged peptides.

Considering the manufacturer's recommendations and accumulated know-how related to NHS chemistry, PEG grafting onto aminated films was performed in PBS. Temperature and reaction time were set to 60°C and 90 min, respectively, based on preliminary testing (data not shown) and the influence of salt concentration was studied (Figure 5-2). Supplementing PBS with up to 5 M NaCl (nearly saturated solution) significantly increased the PEG density from $0.0 \pm 1.2 \times 10^2$ (i.e., below the detection limit of our assay) to $18.2 \pm 0.90 \times 10^2$ pmol/cm² (Figure 5-2-A). Note that the highest PEG density obtained corresponded to 28% of total amino groups that were brought by the PVAm grafting. HUVEC adhesion on those PEG-grafted films was also evaluated (Figure 5-2-B). The addition of salt during the PEG grafting step induced a substantial reduction of cell adhesion down to 23 % compared to PVAm-grafted films. Considering the well-known low-fouling properties of PEG-coated substrates, those results indicated that the PEG coverage was improved by the salt addition, in good agreement with the observed increase in PEG density. For subsequent assays, PEG was grafted in PBS supplemented with 5 M NaCl.

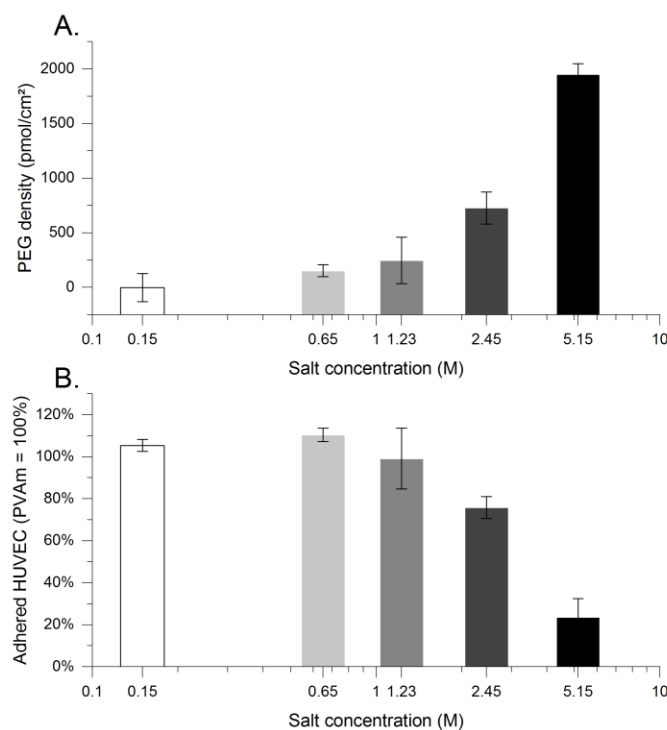


Figure 5-2 : Influence of salt concentration on PEG grafting onto PVAm-coated PET films.

Salt concentration was increased by supplementing the PBS with NaCl up to 5 M. The grafted PEG density (A) was evaluated through cysteine grafting and subsequent absorbance measurement to quantify the amount of released 2-pyridinethiol. Low-fouling PEG coverage (B) was assessed through HUVEC adhesion and subsequent resazurin assay. Data are represented as means and standard deviations of the means derived from three independent assays, each performed in triplicates. ($n=3 \times N=3$)

5.7.1.3 CGG-peptides grafting

For grafting purposes, each tested peptide (RGD, YIGSR, REDV and REVD) was tagged with a CGG sequence at its N-terminus. Thereby harbouring a free thiol, the peptides could be grafted onto the PEG-functionalized films. As cysteine-tagged peptides could undergo oxidation (disulfide bond formation), our 1-mg/mL peptide stocks were characterized through an Ellman assay to quantitate only their reduced form (Tableau 5-1).

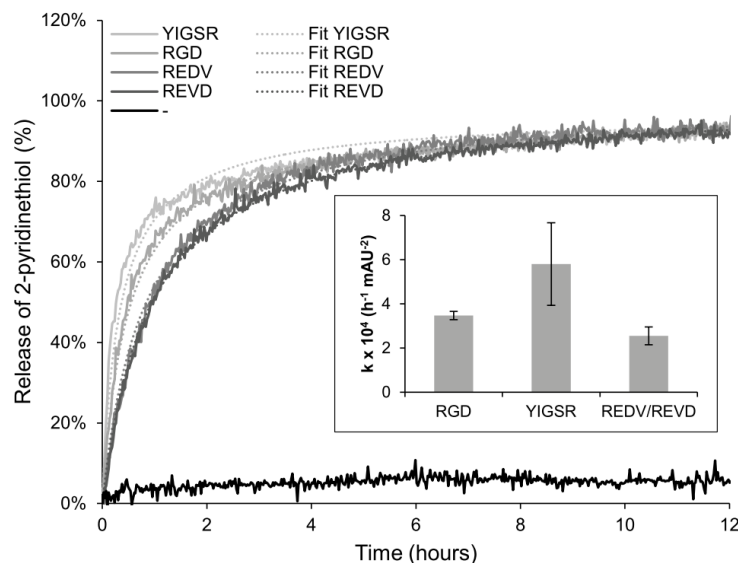


Figure 5-3 : Grafting kinetics of cysteine-tagged peptides on PEG-functionalized PET films.

The grafting reaction was monitored by absorbance thanks to the stoichiometric release of 2-pyridinethiol, as described in the M&M. The equation (1) was used to fit the data. For each peptide, 20 μM were reacted with PEG-functionalized substrates. For each peptide, one representative curve out of four ($n = 4$) is shown on the main figure, along with its corresponding fit. The inset illustrates the kinetic constant k for each peptide, derived from fitting to the equation (1).

As for cysteine alone, the reaction between thiol-containing peptides and PEG molecules induced the release of 2-pyridinethiol, which was monitored by absorbance (**Figure 5-3**). To compare the different grafting curves, a kinetic model was used (see equation (1) in the Materials & Methods section). Note that a second order on the PEG reactant was needed to fit properly the data, which was attributed to steric hindrance effects (data not shown). The total PEG density that was available for peptide grafting (parameter B in equation (1)) amounted to $35.8 \pm 8.5 \text{ mAU}$, i.e. $5.14 \pm 1.15 \mu\text{M}$ of grafted peptides leading to a density of $16.4 \pm 3.7 \times 10^2 \text{ pmol/cm}^2$. That value was not significantly different from the PEG density found through cysteine grafting, i.e. $18.2 \pm 0.9 \times 10^2 \text{ pmol/cm}^2$ (Figure 5-2-A), suggesting that all PEG molecules were available to react with CGG-peptides. Besides, within 20 hours of reaction, the chosen concentration (20 μM) yielded $97 \pm 3 \%$ of that maximal density, indicating that the reaction was complete and that no subsequent blocking step of the PEG molecules was needed. Lower peptide densities were obtained through dilution with mock peptides to keep a total peptide concentration of 20 μM . Even though different from one another, the peptide reaction rates were within the same order of magnitude (see inset in **Figure**

5-3). Thus, a given dilution led to similar densities of peptide of interest, going from about 20 to 2000 pmol/cm² (Tableau 5-2).

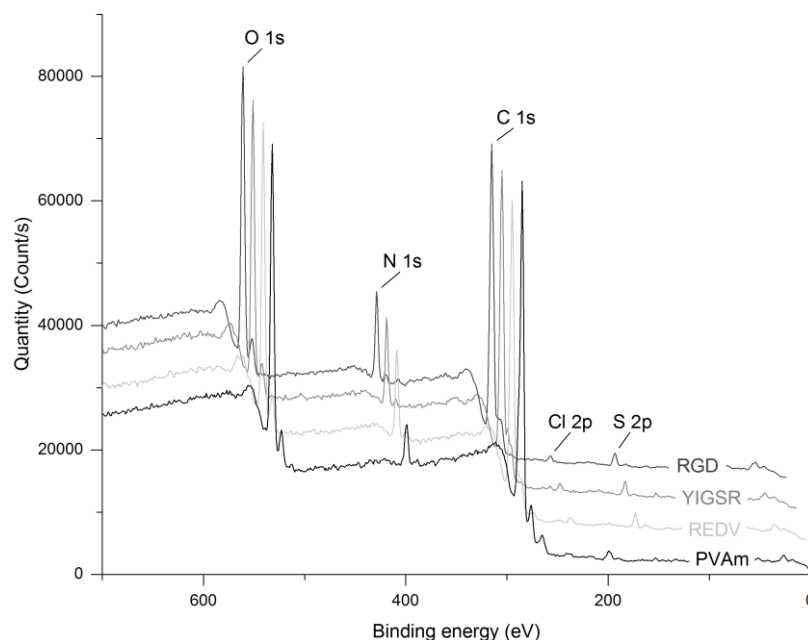
Tableau 5-2 : Grafted peptide densities.

Peptide sequence	Density (pmol/cm ²)		
	100% ^a	10% ^b	1% ^b
CGGRGD		2.1×10^2	0.22×10^2
CGGYIGSR	$16.4 \pm 3.7 \times 10^2$	3.3×10^2	0.37×10^2
CGGREDV		1.6×10^2	0.16×10^2

^a Measured by absorbance. The value is not statistically different from the one obtained with an excess of cysteine ($18.2 \pm 0.9 \times 10^2$ pmol/cm², see Figure 5-2-A).

^b Derived from the kinetics in **Figure 5-3**.

XPS surveys were also performed on peptide-functionalized films, showing an S 2p peak as well as a higher N 1s peak than for PVAm-coated films, thus confirming the peptide grafting. RGD-, YIGSR- and REDV-grafted films presented similar atomic percentages of sulfur and nitrogen (**Figure 5-4**). Such a result confirmed that all peptides were grafted at similar densities, considering that those short peptides hold 10, 12 and 11 nitrogen atoms, respectively, as well as one sulfur atom. Besides, the amount of sulfur (about 1.2 at. %) on peptide-grafted films, which corresponds to the disulfide bonds between the PEG linkers and the cysteine-tagged peptides, was coherent with the amount of nitrogen on PVAm-coated films (about 4.8 at. %). Indeed, those data indicated that PEG-peptide complexes amounted to 0.6 at. % (half of S content), that is to 21% of total amino groups, assuming they correspond to 60% of the N content, as previously characterized (Noel et al., 2011).



at. %	PVAm	REDV	YIGSR	RGD
O 1s	24.3	25.7	24.25	25.50
N 1s	4.80	10.15	9.80	10.25
C 1s	66.85	61.05	64.00	61.90
S 2p	-	1.20	1.20	1.25

Figure 5-4 : XPS characterization of peptide-functionalized PET films. Two surveys were performed on each surface, with one surface per condition. The table data correspond to average values. RGD, YIGSR and REDV refer to corresponding peptide-grafted films at the maximal density (100%). On the figure, data plots are shifted by 10 eV and 5000 counts/s to make observations and comparisons easier.

5.7.2 HUVEC adhesion onto peptide-functionalized PET films

5.7.2.1 Metabolic activity

HUVECs were seeded on top of functionalized PET disks for 1 hour in full medium and metabolic activity of adhered cells was measured by a resazurin assay (**Figure 5-5**). Our control surfaces indicated that the PVAm functionalization increased HUVEC adhesion (1290 ± 77 RFU/min compared to 343 ± 97 RFU/min for pristine disks), which was most likely due to the cationic nature of the polymer. As already mentioned, the PEG grafting to the aminated disk covered at least partly the PVAm underlayer (Figure 5-2-B). Hence, mock-peptide grafted films (denoted as PEG from

Figure 5-5 and on) showed low HUVEC metabolic activity (175 ± 61 RFU/min). Note that cysteine-grafted films behaved similarly (data not shown), confirming the relevance of our mock peptide sequence.

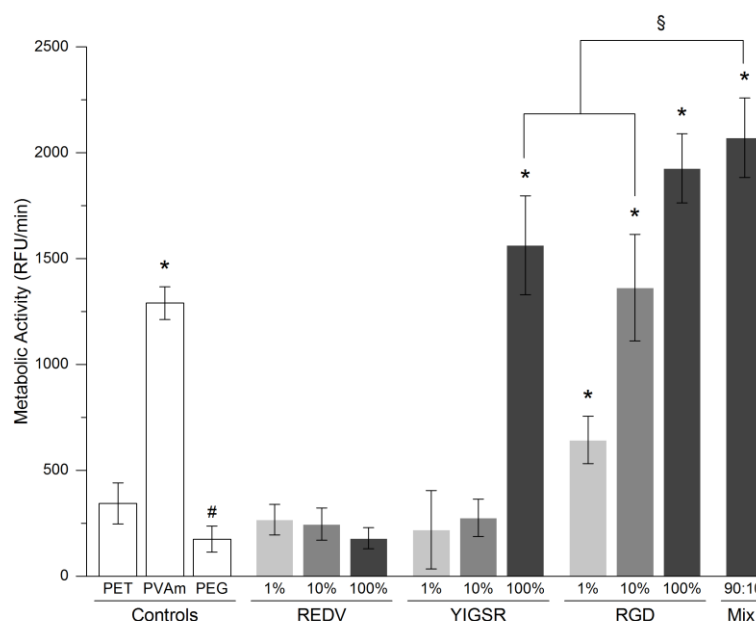


Figure 5-5 : HUVEC adhesion on peptide-functionalized PET films as determined by resazurin assay. Data are represented as means and standard deviations of the means derived from three independent assays, each performed in triplicates. ($n=3 \times N=3$) Groups of data are denoted with a * when significantly different from mock peptide-grafted films (#, $p < 0.05$). The mix group corresponds to a grafting of 90% YIGSR and 10% RGD. A significant difference between the mix and 10% RGD as well as 100% YIGSR was observed (§, $p < 0.05$).

HUVEC adhesion was studied on PET disks functionalized with three peptides of interest, namely RGD, YIGSR and REDV, at densities ranging from about 20 to 2 000 pmol/cm² (Tableau 5-2). As described in the previous section, that range was obtained by mixing the peptides with mock peptides so as not to leave any unoccupied PEG grafting sites. Our results indicated that HUVEC adhesion was not significantly improved by the presence of REDV in the tested density range (179 ± 50 RFU/min for the 100% density). In contrast, YIGSR-grafted films showed a significant increase in HUVEC metabolic activity (up to 1563 ± 234 RFU/min) for the highest density. Decreasing the YIGSR concentration led to a drastic reduction of HUVEC adhesion, down to not

significant (276 ± 88 RFU/min for the 10% condition). On RGD-grafted films, the cell metabolic activity increased from 643 ± 112 RFU/min for the 1% density, up to 1926 ± 163 RFU/min for the 100% density, with all RGD densities showing a significant difference with the control films (PEG, 175 ± 61 RFU/min). Interestingly, RGD and YIGSR enhanced the HUVEC metabolic activity in a comparable manner when grafted at 100% density. A mix of YIGSR and RGD at 90% and 10%, respectively, was also tested. The corresponding functionalized films showed a significantly greater HUVEC metabolic activity (2071 ± 188 RFU/min) than 10% RGD- (1363 ± 251 RFU/min) and 100% YIGSR-grafted films (1563 ± 234 RFU/min), indicating a synergy between the two sequences.

Those HUVEC-seeded substrates were further incubated for up to five days and the cell metabolic activity was measured at day 2 and day 5 (Figure annexe - 2). Our results showed that HUVEC remained viable and were able to proliferate until reaching confluence (about 4000 RFU/min). It was also worth noting that none of the tested adhesive peptides significantly affected the cell proliferation rate (Figure annexe - 2).

5.7.2.2 Density and spreading

Metabolic activity is regulated by many factors making it not necessarily proportional to the number of adhered viable cells. Therefore, as advised in previous reports (Rampersad, 2012; Staton et al., 2009), data derived from the metabolic assay were further completed with actual cell counting and assessment of cell spreading area (**Figure 5-6** and Figure annexe - 3).

Looking at the first functionalization steps (first three columns on **Figure 5-6**), the PVAm-coated films showed an enhanced HUVEC adhesion compared to pristine PET films ($42\,284 \pm 9\,108$ cell/cm² with an area of 840 ± 123 μ m² vs $8\,410 \pm 499$ cell/cm² with an area of 375 ± 129 μ m² for PVAm-coated and pristine PET films, respectively). PEG grafting on top of the aminated layer drastically decreased the HUVEC adhesion by 86% and 59% in terms of cell number and spreading area, respectively.

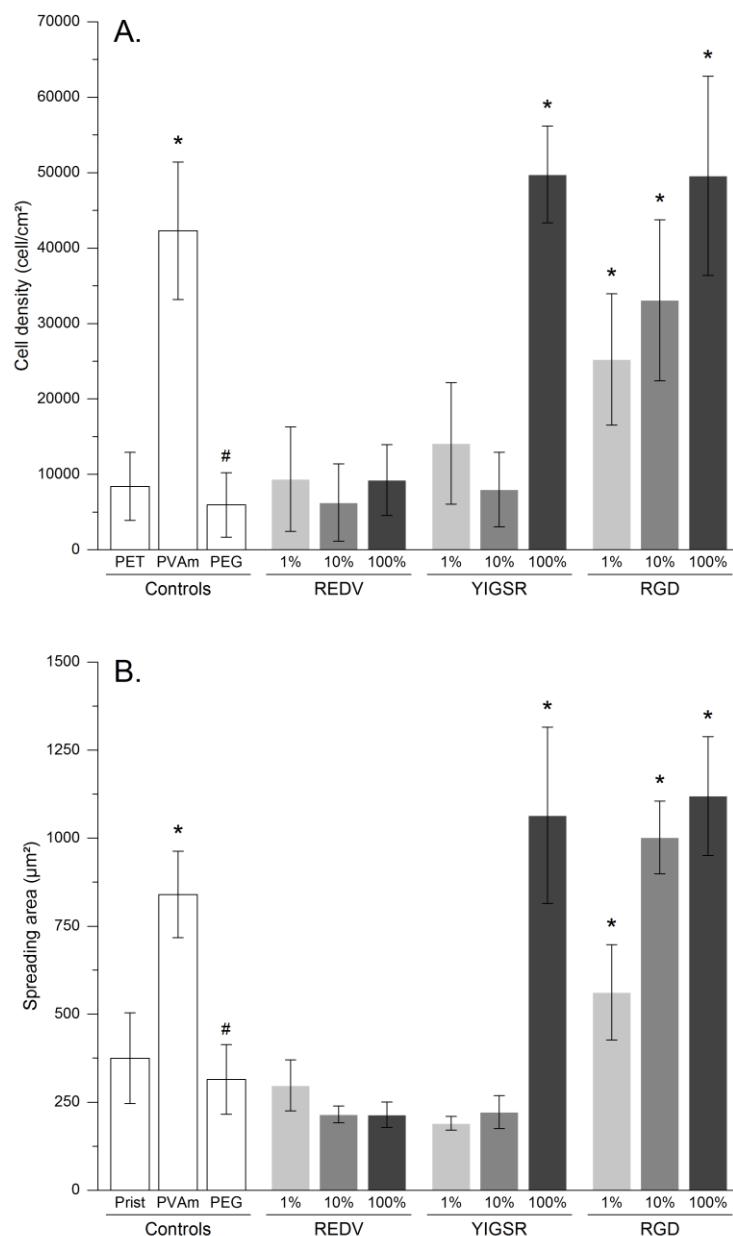


Figure 5-6 : HUVEC attachment (A) and spreading (B) on peptide-functionalized PET films as determined by fluorescent imaging. Data are represented as means and standard deviations of the means derived from six different samples, taken from two independent experiments ($n=3 \times N=2$). The cell density and averaged cell area were measured on five images per sample using the CellProfiler software thanks to nuclei and actin staining (**Figure annexe - 3**). Groups of data are denoted with a * when significantly different from mock peptide-grafted films (#, $p < 0.05$).

REDV grafting did not induce any significant change, neither in the number of adhered cells nor in their spreading area, for all tested densities. YIGSR had a beneficial effect on HUVEC adhesion only for its highest density (100%) where it allowed reaching a cell density of $49\,766 \pm 6424$ cell/cm² with an area of $1\,065 \pm 250$ μm². Unlike YIGSR, the RGD sequence readily induced a significant increase of HUVEC adhesion from the 1% density with $25\,228 \pm 8\,704$ cell/cm² with an area of 562 ± 135 μm². The cell density and area further increased with higher RGD densities up to $49\,603 \pm 13\,199$ cell/cm² with an area of $1\,120 \pm 169$ μm² for the 100% density condition. Besides, compared to the number of seeded HUVECs, that highest cell density (about 50 000 cell/cm²) represented at least 62.5% and up to 100% of total cells (depending whether HUVECs that had leaked outside of the glass cylinder were taken into account in the calculation). Note that HUVEC adhesion (density and spreading area) was statistically similar on 100% RGD- and 100% YIGSR-grafted films, as previously observed for the metabolic activity results. Altogether those results were indeed in excellent agreement with those related to the resazurin assay (Figure annexe - 4).

5.7.2.3 Focal adhesion imaging

To further characterize and illustrate the HUVEC adhesion on our peptide-functionalized PET films, focal adhesion formation was assessed by F-actin and vinculin immunostaining (**Figure 5-7**). On all RGD-functionalized films as well as on the 100% YIGSR-grafted films, HUVEC were largely spread and exhibited well-defined actin fibers (in green) terminated with vinculin-rich sites (in red). The formation of such focal adhesions is characteristic of integrin-mediated adhesion and indicated that HUVECs strongly and rapidly attached to the substrate, as cells were fixed less than 4 hours after seeding. Besides, the increase in HUVEC spreading area as a function of RGD density was clearly visible with such a high magnification. In stark contrast, on all REDV-functionalized films as well as on 1% and 10% YIGSR-grafted films, the cells were more scarce and poorly spread. They showed a rather rounded morphology with fewer stress fibers and no focal adhesion. Altogether, those observations confirmed previous results and suggested a strong risk of cell detachment under blood flow as well as cell death on those poorly adhesive substrates.

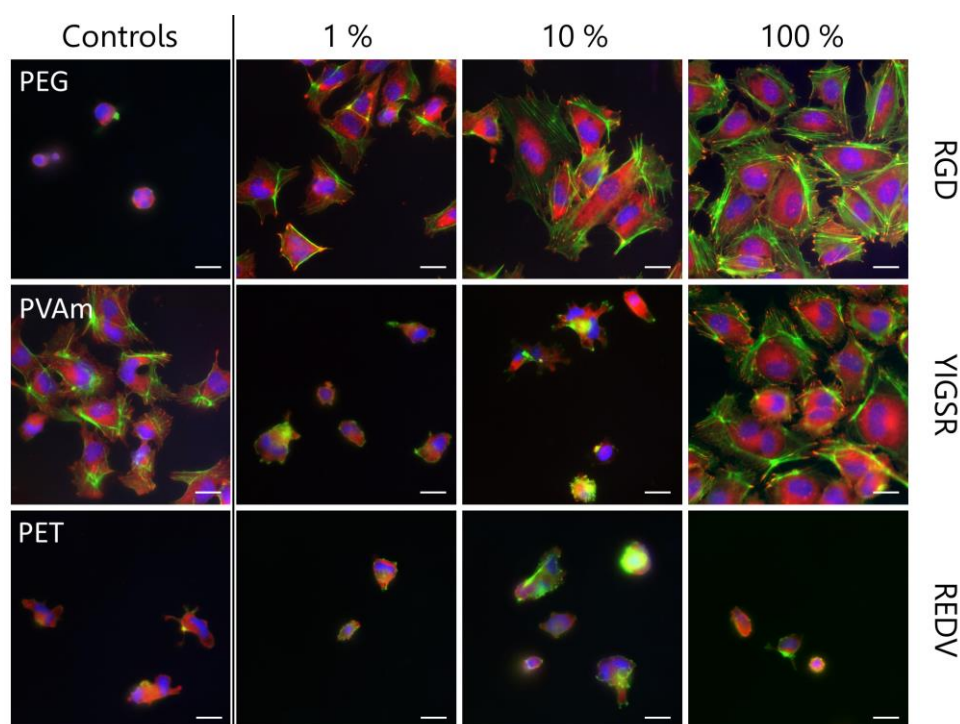


Figure 5-7 : Representative images of HUVEC on peptide-functionalized PET films. Focal adhesions are revealed by vinculin immunostaining (red) while cytoskeleton is visualized by F-actin staining (green). Nuclei (blue) were stained with DAPI. Focal adhesion could be observed for all RGD densities as well as for 100% YIGSR and PVAm-coated films. Scale bars represent 20 μm .

5.7.3 Thrombogenicity of peptide-functionalized PET films

5.7.3.1 Platelet attachment

Peptide-functionalized PET disks were put in contact with human blood to evaluate their ability to repel platelet adhesion. Platelet density (**Figure 5-8A**) and covered area (**Figure 5-8B**) were measured thanks to CD61 immuno-staining (Figure annexe - 5). A strong platelet adhesion was found onto pristine ($1\,550 \pm 198$ platelet/ mm^2 covering $4.01 \pm 0.89\%$ of the surface area) as well as PVAm-coated PET disks ($1\,890 \pm 690$ platelet/ mm^2 covering $5.47 \pm 1.90\%$ of the surface area), as expected from their hydrophobic and positively charged nature, respectively. The introduction of a dense PEG layer allowed reducing those values down to 97 ± 124 platelet/ mm^2 covering $0.12 \pm 0.13\%$ of the surface area. That result illustrated the strong PEG ability to repel platelet adhesion as well as its efficient coverage onto the aminated substrate.

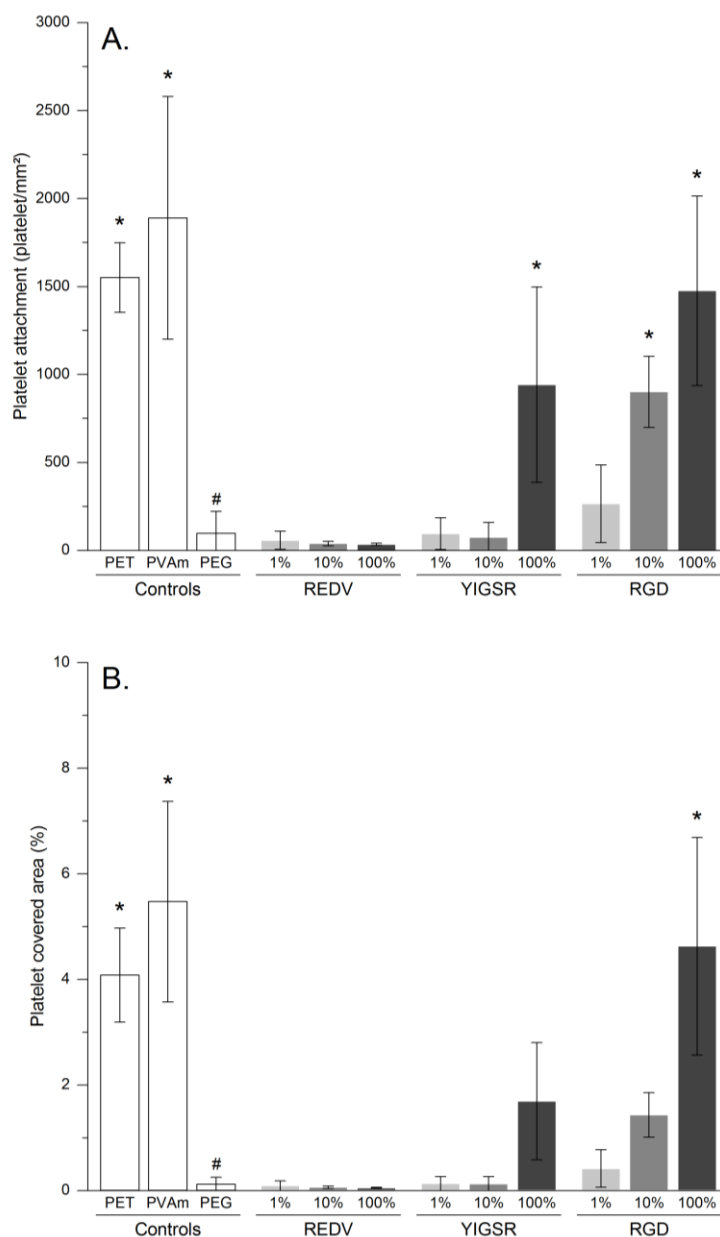


Figure 5-8 : Platelet attachment onto peptide-functionalized PET films as determined by fluorescent imaging. Data are represented as means and standard deviations of the means derived from two different samples, taken from five independent experiments ($n=2 \times N=5$). The blood donor was different in each of those five experiments. The platelet density (A) and covered area (B) were measured on three images per sample using the CellProfiler software thanks to CD61 staining (**Figure annexe - 5**). Among peptide-grafted films, groups of data are denoted with a * when significantly different from mock peptide-grafted films (#, $p < 0.05$).

As expected, grafting of REDV on top of that low-fouling background did not increase the platelet attachment, for whichever density (35 ± 6 platelets/mm² covering $0.05 \pm 0.01\%$ of the surface area for 100% REDV). A significant increase of platelet adhesion was observed for RGD-grafted films as a function of the grafted density, up to $1\,475 \pm 539$ platelet/mm² covering $4.63 \pm 2.06\%$ of the surface area for the 100% density. That result evidenced that even in presence of the PEG underlayer, the RGD peptide was able to interact with platelets, most probably through their $\alpha_{IIb}\beta_3$, $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_5\beta_1$ integrins (Ni & Freedman, 2003). Surprisingly, the 100% YIGSR-grafted films also exhibited a strong platelet attachment, up to 941 ± 556 platelet/mm². However, the platelet covered area on those 100% YIGSR-grafted films ($1.69 \pm 0.01\%$) was not significantly higher than on control films and was significantly lower than on 100% RGD-grafted films, suggesting that YIGSR is a less thrombogenic sequence than RGD.

5.7.3.2 Protein adsorption

Protein adsorption could be evaluated through the increase of nitrogen (N) content of the surface as determined by XPS, since proteins are nitrogen-rich (in at. %) compared to our substrates (**Figure 5-9**) (Martwiset et al., 2006; Michel et al., 2005). Upon contact with 10% FBS (resp. 10% plasma), the PVAm-coated samples showed a N content of 14.2 ± 0.35 at. % (resp. 11.9 ± 0.99 at. %) which was way higher than the one of corresponding control surfaces (4.8 ± 0.28 at. % of N for PBS-incubated PVAm-coated samples). Protein-incubated samples also presented a small amount of sulfur (0.30 ± 0.00 at. % and 0.45 ± 0.07 at. % for 10% FBS and 10% plasma, respectively), which was initially absent. Those data highly suggested a large protein adsorption onto the positively charged samples, as expected, and validated the use of XPS characterization.

Samples incubated with RGD, YIGSR and REDV at their maximal density (100%) were also characterized. In addition to N and S contents, the N/S ratio was also used as an indicator of protein adsorption. Considering XPS scan only the top 5 nm of the samples, the adsorbed protein layer, if any, could attenuate the signal coming from the sample itself. Assuming the S content of adsorbed protein can be neglected; in that case, the S content represented the sample only (disulfide bonds) and was used to correct the N signal. The N/S ratio is therefore a more sensitive indicator of protein adsorption.

Overall, no drastic changes in either N or S contents were observed upon protein incubation, for any of the peptides, suggesting a strong protein-repelling role of the PEG underlayer. Those data

also indicated that the platelet and cell attachment previously characterized most likely occurred via ligand-receptor interaction rather than through an adsorbed protein layer. Nevertheless, compared to RGD- and REDV-grafted samples, the atomic content of YIGSR-grafted surfaces seemed to change slightly more upon incubation with 10% plasma, with a N/S ratio going from 8.15 ± 0.34 for the PBS-incubated control to 11.8 ± 1.74 (**Figure 5-9**). We hypothesized that YIGSR could have either hindered the protein-repellant feature of the PEG underlayer or actively participated to the recruitment of proteins from the plasma.

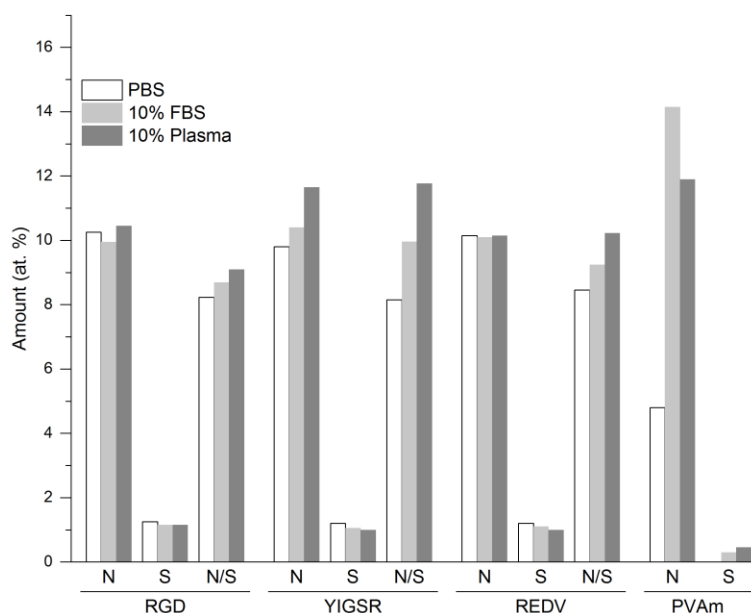


Figure 5-9. Evaluation of protein adsorption on peptide-functionalized PET films as determined by XPS. Two surveys were performed on each surface, with one surface per condition. RGD, YIGSR and REDV refer to corresponding peptide-grafted films at the maximal density (100%). N 1s (N) and S 2p (S) atomic percentages as well as their ratio (N/S) are represented.

5.8 Discussion

In the route of designing vascular implants, many challenges still have to be overcome for the biomaterial to feature adequate surface properties. Synthetic materials such as PET and PTFE, which are used for the replacement of small arteries, often fail to promote endothelialization and induce thrombosis due to platelet activation and adhesion, leading to implant failure. As many recently designed vascular implants involve the use of polyester materials (*e.g.* PET, PLLA, PGA), the surface modification proposed here was developed on PET films (Lei, Rémy, Labrugère, &

Durrieu, 2012; Seifu et al., 2013). The functionalization strategy was based on three main steps: (1) bringing moieties onto inert PET available for subsequent grafting steps, (2) adding a spacing layer acting as both an anti-thrombogenic background and a chemical linker for (3) further grafting of cell adhesive peptides. The first step was extensively developed in our previous report (Noel et al., 2013), keeping in mind that polymeric substrates used in vascular implant design have to feature decisive bulk properties (*e.g.* mechanical) that should not be altered by the surface modification.

Before adding EC adhesive cues to our coating, an anti-thrombogenic background was sought by using a PEG linker as an underlayer. PEG coatings were reported to repel platelet, cell and protein adsorption thanks to their low interfacial surface energy as well as the conformation and high mobility of PEG chains (Jun & West, 2005; Michel et al., 2005). Its low-fouling properties were thus shown to be stronger for high-density layers and long PEG chains (about a few kDa) (Dimitrievska et al., 2011; Gombotz, Guanghui, Horbett, & Hoffman, 1991; Satomi, Nagasaki, Kobayashi, Otsuka, & Kataoka, 2007; Zhu et al., 2001), which are both relevant for peptide grafting. A length of 12 PEG units was chosen, yielding a 1-kDa linker, which was recently found sufficient to reduce protein adsorption (Trzcinska et al., 2014). Regarding the density, it was previously observed that the addition of salt as well as an increase in temperature allowed to reach denser PEG layers (Kingshott, Thissen, & Griesser, 2002; Unsworth, Sheardown, & Brash, 2008). Those conditions decrease the solubility of the PEG molecules (“cloud point”), making grafted ones less inclined to repel soluble ones. Our results confirmed that the higher the ionic strength, the higher the PEG coverage, and allowed us to reach a PEG density of about 20×10^2 pmol/cm² (Figure 5-2). That high PEG density efficiently repelled adsorption of proteins from FBS and from plasma, as determined by XPS characterization (**Figure 5-9**). Altogether, our PEG underlayer enabled focusing on the role of subsequently grafted peptides, screening a large density range as well as studying EC adhesion in complete medium, which is more representative of the *in vivo* conditions, as opposed to the use of serum-free medium (Bellis, 2011).

Among reported EC adhesive peptides, three sequences were selected for our study, namely RGD, YIGSR (from laminin) and REDV (from fibronectin). The well-known RGD peptide was used as a positive control and the two others as potential sequences exhibiting a relative specificity towards ECs over platelets (Hubbell et al., 1991; Massia et al., 1993). The grafting strategy was based on the addition of a CGG tag at the peptide N-terminal, making it versatile for tethering any peptide sequence in an oriented fashion. One interesting feature of the PEG linker was its *o*PSS group,

which released a 2-pyridinethiol upon grafting of a thiolated molecule and allowed for a direct quantification of the peptide density. Such a convenient characterization allowed us to thoroughly examine the grafting conditions and kinetics. In chosen conditions, all tested peptides were able to react at similar rates and to reach high grafting yields (Figure 5-3). Mix of peptides had thus been easily grafted and quantified all along the study, be it with a mock peptide or between bioactive sequences such as RGD and YIGSR. Such a mix had been advised in previous reports (Bellis, 2011; Lei et al., 2012) and was shown here as a proof of concept of the synergy between RGD and YIGSR, as opposed to what Jung *et al.* observed (Jung, Moyano, & Collier, 2011). However, for our application, such a coating was not further considered as the presence of RGD would most probably hamper the PEG anti-thrombogenic properties.

To conduct a comprehensive study, RGD, YIGSR and REDV were tethered on PET disks at various concentrations. The range of peptide densities we report here, from 20 to 2 000 pmol/cm², covered at least partly the range of most studies (60 – 240 pmol/cm² (Chollet et al., 2009), 50 – 100 pmol/cm² (Rémy et al., 2012), 10⁻⁷ – 100 pmol/cm² (Le Saux et al., 2011), 4 – 25 pmol/cm² (Berg et al., 2004)). Other reports explored lower density ranges (2.8 – 4.4 pmol/cm² (Lagunas et al., 2012), 10⁻⁶ pmol/cm² – 1 pmol/cm² (Massia & Hubbell, 1991)). The maximal density we reached was indeed larger than any reported density by at least one order of magnitude, except for one study that reports a (unique) surprisingly high density of 2 × 10⁴ pmol/cm² (Lei et al., 2012). However, it is worth noticing that there is no gold standard to characterize peptide densities. Reported methods include radioactive (Berg et al., 2004; Massia & Hubbell, 1990) and fluorescent (Lei et al., 2012) labeling of peptides with proper calibrations; but also assumptions and estimations to derive densities from XPS atomic percentage (Biltresse, Attolini, & Marchand-Brynaert, 2005; Le Saux et al., 2011; Rémy et al., 2012) or from the grafting of labeled amino acids (Chollet et al., 2007; Chollet et al., 2009). That miscellany of characterization methods partly explains the discrepancy between some reported values. For example, minimal RGD densities required for focal adhesion formation were reported from 10⁻² pmol/cm² (for HUVEC, (Massia & Hubbell, 1991)) to 10 pmol/cm² (for fibroblasts, (Berg et al., 2004)). Note that, even if we did not go lower than 20 pmol/cm², our RGD threshold for focal adhesion formation would most probably fall within that range. Besides, the area itself of the underlying substrate is usually poorly defined as it depends on roughness and polymer conformation at the surface (Causa et al., 2010). On the biological side, cell adhesion depends also on other substrate features such as stiffness (Bellis, 2011). Furthermore,

at a given density, the spatial order of grafted peptides can be of great influence, with disordered patterns being more effective than ordered ones, as observed by Huang and coworkers (Huang et al., 2009). The authors hypothesized that this was due to local high peptide densities allowing for integrin clustering; the latter being essential for focal adhesion formation.

Lessons can nonetheless be learnt from results within a particular study such as this one. RGD has repeatedly been reported to be more efficient to improve HUVEC adhesion than other peptides, at a given density (Lei et al., 2012; Liu, Heilshorn, & Tirrell, 2004). We showed here that the YIGSR sequence could yield the same adhesion levels at a 10 to 100-fold higher density. At high density (about 2 000 pmol/cm²), no significant difference in HUVEC attachment was observed between RGD and YIGSR. Note that those conclusions were drawn from every characterization of HUVEC binding to the substrates we performed, namely metabolic activity (**Figure 5-5**), cell density (**Figure 5-6-A**), spreading area (**Figure 5-6-B**) and focal adhesion formation (**Figure 5-7**). However, no general rules could be drawn regarding the dependence of cell adhesion on peptide density. Indeed, a threshold-like behavior was observed for YIGSR-grafted films whereas RGD-grafted films showed a rather linear trend. It is worth noticing that RGD acts through multiple integrins whereas YIGSR mediates adhesion via the 67 kDa laminin receptor, making their interaction with cells different from one another. Altogether, our results were in good agreement with the recent study by Jung *et al.* on hydrogels, where YIGSR improved HUVEC response when incorporated at a 10-fold higher concentration compared to RGD (Jung et al., 2011). Surprisingly, the promising REDV sequence did not improve HUVEC adhesion in any assay we conducted, suggesting either that its regime stands outside the tested density range or that it does not have a role on HUVEC adhesion in this context. Since its first use by Hubbell *et al.* in 1991 (Hubbell et al., 1991), the REDV peptide was successfully used by several groups (Ceylan et al., 2011; Lin et al., 2012; Park, Hong, Park, & Han, 2010; Plouffe et al., 2007; Wang et al., 2015) but had rather unexpected results in other reports including the works by Jung *et al.* and this one (Jung et al., 2011; Liu et al., 2004; McMillan et al., 2001). Unfortunately, no obvious correlation could be drawn between those results considering differences in cell lines, substrates and characterizations. Further studies on the involved integrins and signaling pathways are warranted to elucidate how REDV potentially mediates EC response.

Regarding thrombogenicity aspects, the PEG dense layer provided an efficient anti-thrombogenic background that successfully abrogated the initial platelet adhesion on aminated films. The affinity

of platelets towards RGD was observed for all tested densities, confirming the non-specificity of RGD and its high platelet adhesion properties. The REDV grafting did not induce any platelet adhesion, as reported by others (Ceylan et al., 2011; Hubbell et al., 1991), but higher densities or grafting strategy should be explored to reach HUVEC adhesion while maintaining such a low platelet adhesion. Although low densities of YIGSR did not lead to any platelet recruitment, the greatest YIGSR density (*ca.* 2 000 pmol/cm²) induced significantly higher platelet adhesion, though smaller than for its RGD counterpart and about half of the level on pristine PET. In their extensive peptide studies, Hubbell and Massia showed that YIGSR did not induce platelet adhesion as expected since “No YIGSR receptor on the platelet has been reported” (Hubbell et al., 1991; Hubbell, Massia, & Drumheller, 1992). Those results were recently confirmed in the works of Jun *et al.* on YIGSR-functionalized polyurethane (Jun & West, 2005; Taite et al., 2008), as well as in a report by Schaff *et al.* suggesting that the interaction between laminin and platelet did not involve the YIGSR sequence (Schaff et al., 2013). Inconsistently, Tandon *et al.* identified the 67 kDa laminin receptor on platelets, through which YIGSR interacts (Tandon et al., 1991). Altogether, platelet interaction with laminin remains ill-defined and still questions whether YIGSR has a role. Apart from that debate, it is worth noting that YIGSR is quite different from REDV and RGD in terms of steric hindrance and chemical properties (charge and hydrophobicity, see Tableau 5-1). Its dense grafting could thus have impeded the low-fouling properties of the PEG underlayer. The influence of the PEG end group chemistry was previously shown to affect its fibrinogen repelling properties (Unsworth, Sheardown, & Brash, 2005). Among peptide-grafted films, the ones covered with 100% YIGSR appeared indeed to recruit the most proteins from plasma (**Figure 5-9**). Therefore, it can be hypothesized that some fibrinogen adsorption occurred and was responsible for platelet attachment on 100% YIGSR-grafted films. Accordingly, other anti-thrombogenic strategies should be explored by grafting longer or branched PEG molecules (Thalla et al., 2013; Zhu et al., 2001), at even higher densities. A cost-effective alternative to bi-functional PEG linkers would be low-fouling polysaccharides such as dextran and chondroitin sulfate (Keuren et al., 2003; Lequoy et al., 2014; Thalla et al., 2014). Such polymeric underlayers could preserve their protein-repellant properties upon peptide grafting and help elucidate the role of YIGSR on platelet attachment *versus* EC adhesion. Additionally, the use of multifunctional polymeric linkers could also promote peptide clustering, thereby enhancing the peptide response. REDV could thus reveal its potential in mediating HUVEC adhesion selectively, if any. Otherwise, another peptide recently

emerged in the work of Dudash *et al.* (Dudash, Kligman, Bastijanic, Kottke-Marchant, & Marchant, 2014): CRRETAWAC, an $\alpha_5\beta_1$ binding sequence, which was isolated from a phage display library and is believed not to interact with platelets. Such a peptide could enable the sought specificity for HUVEC against platelets but our cysteine-based grafting strategy should be revised accordingly.

5.9 Conclusion

A biofunctionalization strategy of polyester materials was thoroughly developed and characterized. The aim was to combine anti-thrombogenic and EC adhesive properties to develop a relevant coating for vascular implants. Those properties were assessed through HUVEC adhesion, platelet attachment and protein adsorption. PEG molecules were successfully grafted onto aminated PET films at such a high density that platelet and protein attachment were fully prevented. Three peptides, namely RGD, YIGSR and REDV, were grafted at densities going from 20 to 2 000 pmol/cm² onto PEG-covered PET films. The RGD sequence was shown to increase HUVEC adhesion and platelet attachment as a function of density, most probably in an integrin-dependent manner. YIGSR was shown to improve HUVEC attachment when grafted at about 2 000 pmol/cm² onto PET films, but unexpectedly favoured platelet adhesion, probably *via* slightly enhanced protein adsorption. In contrast with previous reports, REDV failed to enhance HUVEC adhesion in the explored density range. Thus, YIGSR was found to be the most promising sequence to fulfill the sought properties, regarding HUVEC and platelet adhesion, even though its combination with other agents should be explored to reach complete endothelialization and anti-thrombogenicity. Altogether, we emphasized on the great influence of both sequence and density of grafted adhesive peptides, which should be carefully considered in the development of biofunctionalization strategies in the design of optimal vascular substitutes.

5.10 Supporting information available

Supporting information is available on HUVEC proliferation, up to five days on peptide-modified PET films. Examples of pictures used for cell counting and area evaluation are also provided, as well as a correlation of those with data from the resazurin assay. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org> et en Annexe B.

5.11 Corresponding Author

*E-mail: gregory.decrescenzo@polymtl.ca; Tel: (514) 340-4711 (#7428); Fax: (514) 340-2990

5.12 Acknowledgments

This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Council of Canada (NSERC) and the Canada Research Chair Protein-enhanced Biomaterials (G.D.C.). The authors would also like to thank Louis Villeneuve from the Montreal Heart Institute for his help or advice regarding confocal microscopy as well as Massinissa Si Mehand for the code related to kinetic analysis.

5.13 References

- Avci-Adali, M., Ziemer, G., & Wendel, H. P. (2010). Induction of EPC homing on biofunctionalized vascular grafts for rapid in vivo self-endothelialization - A review of current strategies. *Biotechnology Advances*, 28(1), 119-129. doi: 10.1016/j.biotechadv.2009.10.005
- Bellis, S. L. (2011). Advantages of RGD peptides for directing cell association with biomaterials. *Biomaterials*, 32(18), 4205-4210. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.02.029
- Berg, M. C., Yang, S. Y., Hammond, P. T., & Rubner, M. F. (2004). Controlling Mammalian Cell Interactions on Patterned Polyelectrolyte Multilayer Surfaces. *Langmuir*, 20(4), 1362-1368. doi: 10.1021/la0355489
- Biltresse, S., Attolini, M., & Marchand-Brynaert, J. (2005). Cell adhesive PET membranes by surface grafting of RGD peptidomimetics. *Biomaterials*, 26(22), 4576-4587. doi: 10.1016/j.biomaterials.2004.11.042
- Campbell, G. R., & Campbell, J. H. (2007). Development of Tissue Engineered Vascular Grafts. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 8(1), 43-50. doi: 10.2174/138920107779941426
- Causa, F., Battista, E., Della Moglie, R., Guarnieri, D., Iannone, M., & Netti, P. A. (2010). Surface Investigation on Biomimetic Materials to Control Cell Adhesion: The Case of RGD Conjugation on PCL. *Langmuir*, 26(12), 9875-9884. doi: 10.1021/la100207q

Ceylan, H., Tekinay, A. B., & Guler, M. O. (2011). Selective adhesion and growth of vascular endothelial cells on bioactive peptide nanofiber functionalized stainless steel surface. *Biomaterials*, 32(34), 8797-8805. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.08.018

Chlupáč, J., Filova, E., & Bačáková, L. (2009). Blood vessel replacement: 50 years of development and tissue engineering paradigms in vascular surgery. *Physiological Research*, 58(Suppl 2), S119-S139.

Chollet, C., Chanseau, C., Brouillaud, B., & Durrieu, M. C. (2007). RGD peptides grafting onto poly(ethylene terephthalate) with well controlled densities. *Biomolecular Engineering*, 24(5), 477-482. doi: 10.1016/j.bioeng.2007.07.012

Chollet, C., Chanseau, C., Remy, M., Guignandon, A., Bareille, R., Labrugere, C., . . . Durrieu, M. C. (2009). The effect of RGD density on osteoblast and endothelial cell behavior on RGD-grafted polyethylene terephthalate surfaces. *Biomaterials*, 30(5), 711-720. doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.10.033

Collier, J. H., & Segura, T. (2011). Evolving the use of peptides as components of biomaterials. *Biomaterials*, 32(18), 4198-4204. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.02.030

de Mel, A., Jell, G., Stevens, M. M., & Seifalian, A. M. (2008). Biofunctionalization of Biomaterials for Accelerated in Situ Endothelialization: A Review. *Biomacromolecules*, 9(11), 2969-2979. doi: 10.1021/bm800681k

Delaittre, G., Greiner, A. M., Pauloehrl, T., Bastmeyer, M., & Barner-Kowollik, C. (2012). Chemical approaches to synthetic polymer surface biofunctionalization for targeted cell adhesion using small binding motifs. *Soft Matter*, 8(28), 7323-7347. doi: 10.1039/C2sm07407a

Dimitrievska, S., Maire, M., Diaz-Quijada, G. A., Robitaille, L., Ajji, A., Yahia, L., . . . Bureau, M. N. (2011). Low thrombogenicity coating of nonwoven PET fiber structures for vascular grafts. *Macromolecular Bioscience*, 11(4), 493-502. doi: 10.1002/mabi.201000390

Dudash, L. A., Kligman, F. L., Bastijanic, J. M., Kottke-Marchant, K., & Marchant, R. E. (2014). Cross-reactivity of cell-selective CRRETAWAC peptide with human and porcine endothelial cells. *Journal of Biomedical Materials Research, Part A*, 102(8), 2857-2863. doi: 10.1002/jbm.a.34960

- Fittkau, M. H., Zilla, P., Bezuidenhout, D., Lutolf, M. P., Human, P., Hubbell, J. A., & Davies, N. (2005). The selective modulation of endothelial cell mobility on RGD peptide containing surfaces by YIGSR peptides. *Biomaterials*, 26(2), 167-174. doi: 10.1016/j.biomaterials.2004.02.012
- Goddard, J. M., & Hotchkiss, J. H. (2007). Polymer surface modification for the attachment of bioactive compounds. *Progress in Polymer Science*, 32(7), 698-725. doi: 10.1016/j.progpolymsci.2007.04.002
- Gombotz, W. R., Guanghui, W., Horbett, T. A., & Hoffman, A. S. (1991). Protein adsorption to poly(ethylene oxide) surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research*, 25(12), 1547-1562. doi: 10.1002/jbm.820251211
- Hersel, U., Dahmen, C., & Kessler, H. (2003). RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond. *Biomaterials*, 24(24), 4385-4415. doi: 10.1016/S0142-9612(03)00343-0
- Hibino, N., McGillicuddy, E., Matsumura, G., Ichihara, Y., Naito, Y., Breuer, C., & Shinoka, T. (2010). Late-term results of tissue-engineered vascular grafts in humans. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 139(2), 431-436, 436.e431-432. doi: 10.1016/j.jtcvs.2009.09.057
- Huang, J., Gräter, S. V., Corbellini, F., Rinck, S., Bock, E., Kemkemer, R., . . . Spatz, J. P. (2009). Impact of Order and Disorder in RGD Nanopatterns on Cell Adhesion. *Nano Letters*, 9(3), 1111-1116. doi: 10.1021/nl803548b
- Hubbell, J. A., Massia, S. P., Desai, N. P., & Drumheller, P. D. (1991). Endothelial cell-selective materials for tissue engineering in the vascular graft via a new receptor. *Bio/Technology*, 9(6), 568-572. doi: 10.1038/nbt0691-568
- Hubbell, J. A., Massia, S. P., & Drumheller, P. D. (1992). Surface-grafted Cell-binding Peptides in Tissue Engineering of the Vascular Graft. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 665(1), 253-258. doi: 10.1111/j.1749-6632.1992.tb42589.x
- Humphries, J. D., Byron, A., & Humphries, M. J. (2006). Integrin ligands at a glance. *Journal of Cell Science*, 119(19), 3901-3903. doi: 10.1242/jcs.03098
- Jun, H.-W., & West, J. L. (2005). Modification of polyurethaneurea with PEG and YIGSR peptide to enhance endothelialization without platelet adhesion. *Journal of Biomedical Materials Research, Part B: Applied Biomaterials*, 72B(1), 131-139. doi: 10.1002/jbm.b.30135

- Jung, J. P., Moyano, J. V., & Collier, J. H. (2011). Multifactorial optimization of endothelial cell growth using modular synthetic extracellular matrices. *Integrative Biology*, 3(3), 185-196. doi: 10.1039/c0ib00112k
- Kantlehner, M., Finsinger, D., Meyer, J., Schaffner, P., Jonczyk, A., Diefenbach, B., . . . Kessler, H. (1999). Selective RGD-mediated adhesion of osteoblasts at surfaces of implants. *Angewandte Chemie-International Edition*, 38(4), 560-562. doi: 10.1002/(Sici)1521-3773(19990215)38:4<560::Aid-Anie560>3.0.Co;2-F
- Keuren, J. F. W., Wienders, S. J. H., Willems, G. M., Morra, M., Cahalan, L., Cahalan, P., & Lindhout, T. (2003). Thrombogenicity of polysaccharide-coated surfaces. *Biomaterials*, 24(11), 1917-1924. doi: 10.1016/S0142-9612(02)00620-8
- Kingshott, P., Thissen, H., & Griesser, H. J. (2002). Effects of cloud-point grafting, chain length, and density of PEG layers on competitive adsorption of ocular proteins. *Biomaterials*, 23(9), 2043-2056. doi: 10.1016/S0142-9612(01)00334-9
- Lagunas, A., Comelles, J., Martínez, E., Prats-Alfonso, E., Acosta, G. A., Albericio, F., & Samitier, J. (2012). Cell adhesion and focal contact formation on linear RGD molecular gradients: study of non-linear concentration dependence effects. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 8(4), 432-439. doi: 10.1016/j.nano.2011.08.001
- Le Saux, G., Magenau, A., Gunaratnam, K., Kilian, Kristopher A., Böcking, T., Gooding, J. J., & Gaus, K. (2011). Spacing of Integrin Ligands Influences Signal Transduction in Endothelial Cells. *Biophysical Journal*, 101(4), 764-773. doi: 10.1016/j.bpj.2011.06.064
- Lee, J. W., Park, Y. J., Lee, S. J., Lee, S. K., & Lee, K. Y. (2010). The effect of spacer arm length of an adhesion ligand coupled to an alginate gel on the control of fibroblast phenotype. *Biomaterials*, 31(21), 5545-5551. doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.03.063
- Lei, Y., Rémy, M., Labrugère, C., & Durrieu, M.-C. (2012). Peptide immobilization on polyethylene terephthalate surfaces to study specific endothelial cell adhesion, spreading and migration. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 23(11), 2761-2772. doi: 10.1007/s10856-012-4736-x

- Lequoy, P., Liberelle, B., De Crescenzo, G., & Lerouge, S. (2014). Additive Benefits of Chondroitin Sulfate and Oriented Tethered Epidermal Growth Factor for Vascular Smooth Muscle Cell Survival. *Macromolecular Bioscience*, 14(5), 720-730. doi: 10.1002/mabi.201300443
- Lin, Q.-K., Hou, Y., Ren, K.-F., & Ji, J. (2012). Selective endothelial cells adhesion to Arg-Glu-Asp-Val peptide functionalized polysaccharide multilayer. *Thin Solid Films*, 520(15), 4971-4978. doi: 10.1016/j.tsf.2012.03.041
- Liu, J. C., Heilshorn, S. C., & Tirrell, D. A. (2004). Comparative Cell Response to Artificial Extracellular Matrix Proteins Containing the RGD and CS5 Cell-Binding Domains. *Biomacromolecules*, 5(2), 497-504. doi: 10.1021/bm034340z
- Maheshwari, G., Brown, G., Lauffenburger, D. A., Wells, A., & Griffith, L. G. (2000). Cell adhesion and motility depend on nanoscale RGD clustering. *Journal of Cell Science*, 113 (Pt 10)(10), 1677-1686.
- Martwiset, S., Koh, A. E., & Chen, W. (2006). Nonfouling Characteristics of Dextran-Containing Surfaces. *Langmuir*, 22(19), 8192-8196. doi: 10.1021/la061064b
- Massia, S. P., & Hubbell, J. A. (1990). Covalent surface immobilization of Arg-Gly-Asp- and Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg-containing peptides to obtain well-defined cell-adhesive substrates. *Analytical Biochemistry*, 187(2), 292-301. doi: 10.1016/0003-2697(90)90459-M
- Massia, S. P., & Hubbell, J. A. (1991). An RGD spacing of 440 nm is sufficient for integrin alpha V beta 3-mediated fibroblast spreading and 140 nm for focal contact and stress fiber formation. *Journal of Cell Biology*, 114(5), 1089-1100.
- Massia, S. P., Rao, S. S., & Hubbell, J. A. (1993). Covalently immobilized laminin peptide Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg (YIGSR) supports cell spreading and co-localization of the 67-kilodalton laminin receptor with alpha-actinin and vinculin. *Journal of Biological Chemistry*, 268(11), 8053-8059.
- McMillan, R., Meeks, B., Bensebaa, F., Deslandes, Y., & Sheardown, H. (2001). Cell adhesion peptide modification of gold-coated polyurethanes for vascular endothelial cell adhesion. *Journal of Biomedical Materials Research*, 54(2), 272-283. doi: 10.1002/1097-4636(200102)54:2<272::aid-jbm15>3.0.co;2-3
- Michel, R., Pasche, S., Textor, M., & Castner, D. G. (2005). Influence of PEG Architecture on Protein Adsorption and Conformation. *Langmuir*, 21(26), 12327-12332. doi: 10.1021/la051726h

- Moiseeva, E. P. (2001). Adhesion receptors of vascular smooth muscle cells and their functions. *Cardiovascular Research*, 52(3), 372-386. doi: 10.1016/s0008-6363(01)00399-6
- Moreno, M. J., Ajji, A., Mohebbi-Kalhari, D., Rukhlova, M., Hadjizadeh, A., & Bureau, M. N. (2011). Development of a compliant and cytocompatible micro-fibrous polyethylene terephthalate vascular scaffold. *Journal of Biomedical Materials Research, Part B: Applied Biomaterials*, 97B(2), 201-214. doi: 10.1002/jbm.b.31774
- Nachman, R. L., & Jaffe, E. A. (2004). Endothelial cell culture: beginnings of modern vascular biology. *Journal of Clinical Investigation*, 114(8), 1037-1040. doi: 10.1172/jci23284
- Ni, H. Y., & Freedman, J. (2003). Platelets in hemostasis and thrombosis: role of integrins and their ligands. *Transfusion and Apheresis Science*, 28(3), 257-264. doi: 10.1016/S1473-0502(03)00044-2
- Noel, S., Liberelle, B., Robitaille, L., & De Crescenzo, G. (2011). Quantification of primary amine groups available for subsequent biofunctionalization of polymer surfaces. *Bioconjugate Chemistry*, 22(8), 1690-1699. doi: 10.1021/bc200259c
- Noel, S., Liberelle, B., Yogi, A., Moreno, M. J., Bureau, M. N., Robitaille, L., & De Crescenzo, G. (2013). A non-damaging chemical amination protocol for poly(ethylene terephthalate) - application to the design of functionalized compliant vascular grafts. *Journal Of Materials Chemistry B*, 1(2), 230-238. doi: 10.1039/C2TB00082B
- Nottelet, B., Pektok, E., Mandracchia, D., Tille, J. C., Walpoth, B., Gurny, R., & Möller, M. (2009). Factorial design optimization and in vivo feasibility of poly(ϵ -caprolactone)-micro- and nanofiber-based small diameter vascular grafts. *Journal of Biomedical Materials Research, Part A*, 89A(4), 865-875. doi: 10.1002/jbm.a.32023
- O'Brien, J., Wilson, I., Orton, T., & Pognan, F. (2000). Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European Journal of Biochemistry*, 267(17), 5421-5426. doi: 10.1046/j.1432-1327.2000.01606.x
- Palecek, S. P., Loftus, J. C., Ginsberg, M. H., Lauffenburger, D. A., & Horwitz, A. F. (1997). Integrin-ligand binding properties govern cell migration speed through cell-substratum adhesiveness. *Nature*, 385(6616), 537-540. doi: 10.1038/385537a0

- Pankajakshan, D., & Agrawal, D. K. (2010). Scaffolds in tissue engineering of blood vessels. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 88(9), 855-873. doi: 10.1139/y10-073
- Park, C., Hong, Y., Park, K., & Han, D. (2010). Peptide-grafted lactide-based poly(ethylene glycol) porous scaffolds for specific cell adhesion. *Macromolecular Research*, 18(5), 526-532. doi: 10.1007/s13233-010-0517-9
- Plouffe, B. D., Njoka, D. N., Harris, J., Liao, J., Horick, N. K., Radisic, M., & Murthy, S. K. (2007). Peptide-Mediated Selective Adhesion of Smooth Muscle and Endothelial Cells in Microfluidic Shear Flow. *Langmuir*, 23(9), 5050-5055. doi: 10.1021/la0700220
- Plouffe, B. D., Radisic, M., & Murthy, S. K. (2008). Microfluidic depletion of endothelial cells, smooth muscle cells, and fibroblasts from heterogeneous suspensions. *Lab on a Chip*, 8(3), 462-472. doi: 10.1039/b715707j
- Rahmany, M. B., & Van Dyke, M. (2013). Biomimetic approaches to modulate cellular adhesion in biomaterials: A review. *Acta Biomaterialia*, 9(3), 5431-5437. doi: 10.1016/j.actbio.2012.11.019
- Rampersad, S. N. (2012). Multiple Applications of Alamar Blue as an Indicator of Metabolic Function and Cellular Health in Cell Viability Bioassays. *Sensors*, 12(9), 12347-12360. doi: 10.3390/s120912347
- Rémy, M., Bareille, R., Rerat, V., Bourget, C., Marchand-Brynaert, J., & Bordenave, L. (2012). Polyethylene terephthalate membrane grafted with peptidomimetics: endothelial cell compatibility and retention under shear stress. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 1-18. doi: 10.1080/09205063.2012.690275
- Satomi, T., Nagasaki, Y., Kobayashi, H., Otsuka, H., & Kataoka, K. (2007). Density Control of Poly(ethylene glycol) Layer To Regulate Cellular Attachment. *Langmuir*, 23(12), 6698-6703. doi: 10.1021/la0624384
- Schaff, M., Tang, C., Maurer, E., Bourdon, C., Receveur, N., Eckly, A., . . . Mangin, P. H. (2013). Integrin $\alpha 6 \beta 1$ Is the Main Receptor for Vascular Laminins and Plays a Role in Platelet Adhesion, Activation, and Arterial Thrombosis. *Circulation*, 128(5), 541-552. doi: 10.1161/circulationaha.112.000799
- Seifu, D. G., Purnama, A., Mequanint, K., & Mantovani, D. (2013). Small-diameter vascular tissue engineering. *Nature Reviews. Cardiology*, 10(7), 410-421. doi: 10.1038/nrcardio.2013.77

- Shin, H., Jo, S., & Mikos, A. G. (2003). Biomimetic materials for tissue engineering. *Biomaterials*, 24(24), 4353-4364. doi: 10.1016/S0142-9612(03)00339-9
- Staton, C. A., Reed, M. W. R., & Brown, N. J. (2009). A critical analysis of current in vitro and in vivo angiogenesis assays. *International Journal of Experimental Pathology*, 90(3), 195-221. doi: 10.1111/j.1365-2613.2008.00633.x
- Taite, L. J., Yang, P., Jun, H.-W., & West, J. L. (2008). Nitric oxide-releasing polyurethane-PEG copolymer containing the YIGSR peptide promotes endothelialization with decreased platelet adhesion. *Journal of Biomedical Materials Research, Part B: Applied Biomaterials*, 84B(1), 108-116. doi: 10.1002/jbm.b.30850
- Tandon, N. N., Holland, E. A., Kralisz, U., Kleinman, H. K., Robey, F. A., & Jamieson, G. A. (1991). Interaction of human platelets with laminin and identification of the 67 kDa laminin receptor on platelets. *Biochemical Journal*, 274 (Pt 2), 535-542.
- Thalla, P. K., Contreras-Garcia, A., Fadlallah, H., Barrette, J., De Crescenzo, G., Merhi, Y., & Lerouge, S. (2013). A versatile star PEG grafting method for the generation of nonfouling and nonthrombogenic surfaces. *BioMed Research International*, 2013, 962376. doi: 10.1155/2013/962376
- Thalla, P. K., Fadlallah, H., Liberelle, B., Lequoy, P., De Crescenzo, G., Merhi, Y., & Lerouge, S. (2014). Chondroitin Sulfate Coatings Display Low Platelet but High Endothelial Cell Adhesive Properties Favorable for Vascular Implants. *Biomacromolecules*, 15(7), 2512-2520. doi: 10.1021/bm5003762
- Trzcinska, R., Balin, K., Kubacki, J., Marzec, M. E., Pedrys, R., Szade, J., . . . Trzebicka, B. (2014). Relevance of the Poly(ethylene glycol) Linkers in Peptide Surfaces for Proteases Assays. *Langmuir*, 30(17), 5015-5025. doi: 10.1021/la500457q
- Unsworth, L. D., Sheardown, H., & Brash, J. L. (2005). Protein Resistance of Surfaces Prepared by Sorption of End-Thiolated Poly(ethylene glycol) to Gold: Effect of Surface Chain Density. *Langmuir*, 21(3), 1036-1041. doi: 10.1021/la047672d
- Unsworth, L. D., Sheardown, H., & Brash, J. L. (2008). Protein-resistant poly(ethylene oxide)-grafted surfaces: Chain density-dependent multiple mechanisms of action. *Langmuir*, 24(5), 1924-1929. doi: 10.1021/La702310t

- Vara, D. S., Salacinski, H. J., Kannan, R. Y., Bordenave, L., Hamilton, G., & Seifalian, A. M. (2005). Cardiovascular tissue engineering: state of the art. *Pathologie Biologie*, 53(10), 599-612. doi: 10.1016/j.patbio.2004.12.006
- Ventre, M., Causa, F., & Netti, P. A. (2012). Determinants of cell–material crosstalk at the interface: towards engineering of cell instructive materials. *Journal of the Royal Society, Interface*, 9(74), 2017-2032. doi: 10.1098/rsif.2012.0308
- Wang, W., Guo, L., Yu, Y., Chen, Z., Zhou, R., & Yuan, Z. (2015). Peptide REDV-modified polysaccharide hydrogel with endothelial cell selectivity for the promotion of angiogenesis. *Journal of Biomedical Materials Research, Part A*, 103(5), 1703-1712. doi: 10.1002/jbm.a.35306
- Wei, Y., Ji, Y., Xiao, L., Lin, Q., & Ji, J. (2011). Different complex surfaces of polyethyleneglycol (PEG) and REDV ligand to enhance the endothelial cells selectivity over smooth muscle cells. *Colloids and Surfaces, B: Biointerfaces*, 84(2), 369-378. doi: 10.1016/j.colsurfb.2011.01.028
- Zhu, B., Eurell, T., Gunawan, R., & Leckband, D. (2001). Chain-length dependence of the protein and cell resistance of oligo(ethylene glycol)-terminated self-assembled monolayers on gold. *Journal of Biomedical Materials Research*, 56(3), 406-416. doi: 10.1002/1097-4636(20010905)56:3<406::aid-jbm1110>3.0.co;2-r

CHAPITRE 6 ARTICLE 3 – CO-IMMOBILIZATION OF ADHESIVE PEPTIDES AND VEGF WITHIN A DEXTRAN-BASED COATING FOR VASCULAR APPLICATIONS

Co-immobilisation de peptides d'adhésion et de VEGF au sein d'un revêtement de dextrane pour applications vasculaires

Cet article adresse l'objectif 3 : « Développer un revêtement assurant l'adhésion et la prolifération de cellules endothéliales sans favoriser la prolifération des cellules musculaires lisses. » en se basant sur les hypothèses suivantes :

- Hypothèse 3 : Il existe un peptide permettant l'adhésion sélective des cellules endothéliales par rapport aux cellules musculaires lisses et aux plaquettes.
- Hypothèse 4 : Un revêtement de dextrane représente une alternative naturelle et moins coûteuse au PEG.
- Hypothèse 5 : Le facteur de croissance VEGF améliore la prolifération des cellules endothéliales mais pas celle des cellules musculaires lisses.
- Hypothèse 6 : La densité de peptides/protéines greffés a une influence importante sur les effets cellulaires observés et peut être optimisée.
- Hypothèse 7 : La co-immobilisation de peptides d'adhésion et de VEGF amène une synergie au niveau de l'adhésion et de la prolifération cellulaire, pouvant être optimisée en jouant sur les densités.

6.1 Résumé

Des structures multifonctionnelles, fournissant un environnement propice à l'adhésion et à la croissance de types cellulaires choisis, sont nécessaires à la plupart des applications de l'ingénierie tissulaire et de la médecine régénératrice. Dans ce contexte, du dextrane modifié avec des groupements vinylsulfone (VS) a été employé comme matrice présentant des propriétés anti-adhésives (*low-fouling*) ainsi que de multiples fonctions polyvalentes. Les groupements VS exposés par le dextrane-VS peuvent en effet réagir avec des thiols, des amines ou des hydroxyles, que ce soit pour le greffage sur des surfaces, la réticulation ou la conjugaison à des biomolécules. Une bibliothèque de dextrane-VS a ainsi été produite, greffée sur des puits aminés et caractérisée en termes de degré de modification (%VS), propriétés anti-adhésives vis à vis des cellules

endothéliales (EC) et des SMC et capacité à recruter des peptides étiquetés avec une cystéine. Des peptides d'adhésion (e.g. RGD) ainsi que le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) ont été co-immobilisés sur le meilleur dextrane-VS (% VS = environ 50% des unités saccharides). RGD et VEGF ont pu être efficacement immobilisés à de fortes densités (environ 1 nmol/cm² et 50 fmol/cm², respectivement), et ont permis d'améliorer à la fois l'adhésion des EC et leur prolifération. Cette dernière était aussi forte qu'en présence de VEGF soluble, et était sélective aux EC vis-à-vis des SMC. Dans l'ensemble, de multiples biomolécules ont pu être incorporés à notre revêtement de dextrane-VS, tout en conservant leur bioactivité respective.

6.2 Header

CO-IMMOBILIZATION OF ADHESIVE PEPTIDES AND VEGF WITHIN A DEXTRAN-BASED COATING FOR VASCULAR APPLICATIONS

Samantha Noel^{†,§}, Charles Fortier^{†,§}, Frederic Murschel^{†,§}, Antoine Belzil[§], Guillaume Gaudet[§], Mario Jolicœur[†], Gregory De Crescenzo^{†,}.*

[†] Department of Chemical Engineering, Groupe de Recherche en Sciences et Technologies Biomédicales, Bio-P² Research Unit, École Polytechnique de Montréal, P.O. Box 6079, succ. Centre-Ville, Montréal (QC), H3C 3A7, Canada

[§] Institute of Biomedical Engineering, École Polytechnique de Montréal, P.O. Box 6079, succ. Centre-Ville, Montréal (QC), H3C 3A7, Canada

* Corresponding Author :

E-mail: gregory.decrescenzo@polymtl.ca

Tel: (514) 340-4711 (#7428)

Fax: (514) 340-2990

6.3 Abstract

Multifunctional constructs providing a proper environment for adhesion and growth of selected cell types are needed for most tissue engineering and regenerative medicine applications. In this context, vinylsulfone (VS)-modified dextran was proposed as a matrix featuring low-fouling properties as well as multiple versatile moieties. The displayed VS groups could indeed react with thiol, amine or hydroxyl groups, be it for surface grafting, crosslinking or subsequent tethering of

biomolecules. In the present study, a library of dextran-VS was produced, grafted to aminated substrates and characterized in terms of degree of VS modification (% VS), cell-repelling properties and potential for the oriented grafting of cysteine-tagged peptides. As a bioactive coating of vascular implants, ECM peptides (e.g. RGD) as well as vascular endothelial growth factor (VEGF) were co-immobilized on the most suitable dextran-VS coating (% VS = *ca.* 50% of saccharides units). Both RGD and VEGF were efficiently tethered at high densities (*ca.* 1 nmol/cm² and 50 fmol/cm², respectively), and were able to promote endothelial cell adhesion as well as proliferation. The latter was enhanced to the same extent as with soluble VEGF and proved selective to endothelial cells over smooth muscle cells. Altogether, multiple biomolecules could be efficiently incorporated into a dextran-VS construct, while maintaining their respective biological activity.

6.4 Keywords

Cell selectivity; ECM peptides; VEGF; co-immobilization; dextran; vinylsulfone.

6.5 Introduction

Tissue engineering and regenerative medicine strive to provide a proper environment for repair, healing and (re)generation of biological tissue. The biomaterials community now embraces the fact that implants need to combine structural support *via* synthetic or natural polymer constructs, and bioactive integration, through biomolecule incorporation and cell colonization. In that endeavor, most strategies take inspiration from the complex array of physical, chemical and biological cues provided by the extracellular matrix (ECM) during natural processes such as healing and angiogenesis (Rice et al., 2013).

While building these smart implants, a key starting point is to mediate adhesion of relevant cell types at the material surface, which has been extensively studied through incorporation of ECM proteins (*e.g.* collagen, fibronectin, vitronectin, laminin) (Delaittre et al., 2012; Goddard & Hotchkiss, 2007). Within those proteins, key peptide sequences have been identified – *e.g.* RGD, YIGSR (from laminin), REDV (from fibronectin) as well as CAG (from collagen type IV) – and are now commonly used as they ease handling, synthesis and grafting procedures compared to their whole protein counterparts (de Mel et al., 2008; Delaittre et al., 2012). Another interesting family of biomolecules is that of growth factors (GF), which are involved in the regulation of many events such as cell differentiation, proliferation, survival and migration (Ito, 2008; Joddar & Ito, 2011).

Among GF, the vascular endothelial growth factor (VEGF) attracts most interest for its predominant role in angiogenesis, which is critical for the repair and regeneration of most tissues, as well as for the re-endothelialization of vascular implants (Murschel et al., 2013; Shen et al., 2008; Shin et al., 2012).

In their native environment, many GF (e.g. FGF-2, VEGF, PDGF) are sequestered within the ECM, from where they are released and interact with cells through activation of their receptors (Eliceiri, 2001; Rice et al., 2013). Direct contact between GF, ECM proteins and corresponding cell receptors may even be essential for GF to induce their signalling, as reported for heparin-binding VEGF₁₆₅ (T. T. Chen et al., 2010). Of interest, some studies have reported enhanced and/or prolonged cellular response in the presence of both ECM proteins and GF (Le Saux et al., 2011; Lee et al., 2012). In particular, there is evidence for a cooperative signaling between VEGFR-2 and several integrins including $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$ and β_1 integrins (Byzova et al., 2000; Eliceiri, 2001; Le Saux et al., 2011). Altogether, 2D as well as 3D supports allowing for co-immobilization of multiple biomolecules such as GF and integrin-recognized ECM sequences would be of great interest for applications in tissue engineering, regenerative medicine as well as biotechnology (Joddar & Ito, 2011; Yang et al., 2013).

Immobilization of biomolecules in a stable if not covalent manner is desirable in most cases so as to provide a sustained as well as local cellular response (Ito, 2008; Joddar & Ito, 2011). Protein grafting is commonly achieved through carbodiimide chemistry, targeting amino groups from lysine residue side-chains (Delaittre et al., 2012; Goddard & Hotchkiss, 2007; Leslie-Barbick et al., 2009; Shen et al., 2008). However, targeting such an abundant moiety has been shown to hamper the conformation and bioactivity of the grafted protein (Delaittre et al., 2012; Galas & Liu, 2014; Hu et al., 2012; López Jaramillo, Hernández Mateo, & Santoyo González, 2012). Accordingly, different strategies have been developed to overcome these limitations, such as site-specific tethering (Camarero, 2008) or the use of recombinant affinity tags (Joddar & Ito, 2011; Liberelle et al., 2010). Among them, coiled-coil motifs such as the E5/K5 tandem have received a growing attention for their stability and versatility (Mason & Arndt, 2004; White et al., 2012). Accordingly, we have developed such a capture system based on the immobilization of recombinant E5-tagged growth factors onto K5-functionalized supports in an oriented, stable and site-specific manner (Boucher et al., 2008; Murschel et al., 2013).

Unlike proteins, short peptides – including K5 – can be conveniently synthesized with additional residues such as a cysteine, which is rare enough to be absent from the key sequence and exhibits a free thiol group for site-specific grafting (Noel, Hachem, Merhi, & De Crescenzo, 2015). Sulfhydryl-containing peptides may be grafted through the formation of a disulfide bond, but its stability may not be suitable due to its dynamic nature (Delaittre et al., 2012). Michael acceptors, such as the vinylsulfone (VS) moiety, address this limitation by creating a stable thioether bond with thiols (López Jaramillo et al., 2012). Additionally, the VS group presents appealing characteristics regarding water stability and lack of by-products (Morales-Sanfrutos et al., 2010). Interestingly, the versatile VS moiety can readily and selectively react with sulfhydryl in mild conditions (water, pH 7-9), as well as with secondary targets (amine and hydroxyl) in alkaline conditions (pH 10 and higher) (Cheng, Shang, & Ratner, 2010; López Jaramillo et al., 2012).

Polysaccharides such as dextran contain hydroxyl groups that can be converted to VS functionalities upon reaction with divinylsulfone (DVS) in strongly alkaline conditions (Yu & Chau, 2012). Dextran has been shown to repel protein and limit cell adsorption thanks to its neutral and highly hydrated character, similarly to PEG coatings (Baldwin & Kiick, 2010; Holland et al., 1998; Martwiset et al., 2006; Österberg et al., 1993). Besides, like other non-mammalian polysaccharides, its relatively low cost and availability in a wide molecular weight range makes dextran a really attractive compound in the field of polymer conjugates for biomaterials (Baldwin & Kiick, 2010; Martwiset et al., 2006). Those interesting properties make that polysaccharide an ideal matrix for specific biomolecule immobilization and signaling without background interferences, be it on 2D-coatings (Monchaux & Vermette, 2007) or within 3D-hydrogels (Mergy, Fournier, Hachet, & Auzély-Velty, 2012; Yu & Chau, 2012). For 2D-coating purposes, dextran-VS can be grafted onto aminated substrates, which are routinely obtained through either plasma or wet chemistry methods (Goddard & Hotchkiss, 2007; Noel et al., 2013; Savoji et al., 2014; Zhu et al., 2013). Altogether, many supports could be decorated with a dextran matrix displaying free VS groups available for subsequent functionalization with various relevant biomolecules.

As an example, small-diameter vascular grafts could benefit from such a biofunctionalization strategy. As the endothelium still represents the ideal surface for blood contact, recent strategies have focused on improving graft endothelialization through surface modification (Avci-Adali et al., 2010; de Mel et al., 2008; Ren et al., 2015). In this context, EC-selective biomolecules are required to preventing the undesirable attachment of other cell types (SMC) and blood components

(platelets, proteins), as recently reviewed (Ren et al., 2015), and dextran-VS could be an adequate immobilization platform (de Mel, Cousins, & Seifalian, 2012; Thalla et al., 2014).

In the present study, a library of dextrans with various molecular weights and degrees of VS modification was prepared and grafted on *in-house* aminated microplates as a first layer of a multifunctional coating. ECM peptides, namely RGD, YIGSR, REDV and CAG, were co-immobilized with a K5 peptide allowing for the subsequent E5-tagged GF capture. The selectivity of the ECM motifs as well as their synergistic action with VEGF was evaluated through HUVEC and AoSMC adhesion and proliferation assays.

6.6 Materials and methods

6.6.1 Material and reagents

6.6.1.1 Chemicals

Milli-Q water (18.2 MΩ/cm; total organic compounds (TOC) = 4 ppb) was generated with a Millipore Gradient A 10 purification system. Isopropyl alcohol (99.5% purity), dioxane (99+% purity), and hydrochloric acid (HCl, 37.7% v/v) were obtained from VWR International, Ltd. (Mont-Royal, QC). Anhydrous ethylic alcohol (EtOH, 99.9% purity) was purchased from Comalco. Unless mentioned otherwise, all chemicals were purchased from Sigma-Aldrich Canada, Ltd. (Oakville, ON).

The linear aminated polymer polyallylamine (PAAm) was obtained from Polysciences, Inc. (Warrington, PA). All dextrans (technical grade T) were purchased from Pharmacosmos A/S (Holbaek, Denmark). Deuterium oxide (99% purity) was purchased from Cambridge Isotope Laboratories, Inc. (Andover, MA).

6.6.1.2 Peptides

All peptides, i.e. CGGRGD, CGGRGE, CGGYIGSR, CGGSGIYR, CGGREDEV, CAG and CGG-(KVSALKE)₅ (named K5), were synthesized at the peptide facility at the University of Colorado (>98% purity). Each lyophilized peptide powder was dissolved at 1 mg/mL in 0.1 % acetic acid in Milli-Q water, aliquoted and stored at -80°C to prevent disulfide bond formation. Free thiols were quantified for each peptide thanks to Ellman's assay (see further) to adjust grafting concentrations.

6.6.1.3 E5-VEGF

The chimeric protein E5-VEGF, consisting of a VEGF₁₆₅ protein fused to a N-terminal E5 tag (i.e., the K5-binding peptide that have the following sequence: (EVSALEK)₅), was produced in HEK 293-6E cells and purified by immobilized metal-ion affinity chromatography (IMAC) as previously described (Murschel et al., 2013). Protein concentration was determined by ELISA. Purified E5-VEGF was then stored at -80°C until use. hVEGF₁₆₅ ELISA kits were purchased from R&D systems (Minneapolis, MN).

6.6.1.4 Cell culture reagents

Primary human umbilical vein endothelial cells (HUVEC, pooled) and aortic smooth muscle cells (AoSMC) were purchased from Lonza (Walkersville, MD), as well as their respective cell culture media: Endothelial Growth Medium-2 (EBM[®]-2 + EGM[®]-2 SingleQuots™ Kit containing fetal bovine serum (FBS, 2% v/v), growth factors (EGF, VEGF, IGF, FGF), ascorbic acid, heparin, hydrocortisone and antibiotics) and Smooth muscle Growth Medium-2 (SmBM[®]-2 + SmGM[®]-2 SingleQuots™ Kit containing FBS (5% v/v), growth factors (EGF, FGF), insulin and antibiotics). 96-well CellBIND[®] microplates, as well as 25- and 75-cm² CellBIND[®] flasks used for culturing, were bought from Corning (Corning, NY).

6.6.2 Dextran-VS production and characterization

Technical grade dextrans of three molecular weights, namely 20 kDa (T20), 40 kDa (T40), and 70 kDa (T70), were modified with DVS according to a protocol adapted from the one of Yu and Chau (Yu & Chau, 2012). For clarity sake, each VS-modified dextran (or dextran-VS) will be named by a code name featuring its molecular weight and the NaOH concentration (in mM) used for its synthesis. For example, 70k-75 will stand for dextran T70 modified with 75 mM of NaOH, which was synthesized as follows.

Five hundred milligrams of dextran T70 were dissolved in 15 mL of Milli-Q water containing 75 mM of NaOH. Ten milliliters of a freshly prepared DVS solution (0.11 M in water containing 75 mM NaOH) were added instantly to the dextran solution. The final mix consisted of 2 % w/v of dextran, which corresponds to 0.37 M of hydroxyl groups, and the DVS:OH ratio was of 1.16:1. The mix was allowed to react for 3 min under vigorous vortexing and was stopped by lowering

the pH down to below 5. This was performed by adding 180 μ L of pure HCl (*ca.* 12 M) into the mix, leading to 90 mM of HCl in the mix, compensating the initial 75 mM of NaOH.

For purification purposes, all dextran-VS were ultra-filtered by Amicon Ultra-15 (Millipore, U.S.A.) against Milli-Q water. A cut-off of 3 kDa was used for dextran T20 and one of 10 kDa for dextrans T40 and T70. The purified dextran-VS were then freeze-dried and subsequently examined by $^1\text{H-NMR}$ as 5 mg/mL solutions in D_2O .

6.6.3 96-well plates functionalization

6.6.3.1 Amination

PAAm was grafted to 96-well plates through carbodiimide chemistry between its amino groups and the carboxylic groups of the CellBIND[®] surface (Pardo et al., 2005). PAAm (supplied as a 15 % w/v solution) was diluted ~25 times in MES buffer (100 mM, pH 4.7) containing NHS (40 mM) and EDC (10 mM), resulting in a solution containing 100 mM of NH_2 moieties. After 20h of reaction at room temperature (r.t.), aminated wells were then rinsed with Milli-Q water, ethanol and Milli-Q water. The aminated wells were characterized in terms of available amino group density by the Orange II assay (Noel et al., 2011).

6.6.3.2 Dextran-VS grafting

Fresh dextran-VS solutions (10 mg/mL in borate 50 mM pH 10, 150 μ L/well) were added to each well and allowed to react for 20 hours at r.t. A quantitation of the remaining free amino groups was performed at that point to qualitatively assess the dextran-VS grafting (Fig S1 shows the results for selected dextran-VS).

6.6.3.3 K5 peptide grafting

For the purpose of subsequent E5-VEGF capture, K5 peptides were reacted with dextran-functionalized wells. When mentioned, a fresh CGG-K5 solution (1 μ M in PBS, 100 μ L/well) was added to each well and allowed to react for 24h at r.t. The K5 grafting was later characterized through E5-VEGF capture.

6.6.3.4 Cell-adhesive peptide grafting

CGGRGD, CGGYIGSR, CGGREDV and CAG as well as control sequences CGGRGE and CGGSGIYR, were reacted with dextran-functionalized wells at concentrations varying from 1.56 to 100 μ M in PBS (150 μ L/well). If not specified, the grafting concentration was 10 μ M. After 20 hours of reaction at r.t., 140 μ L of the peptide-containing supernatants were collected to perform an Ellman's assay, as previously described (Noel et al., 2015). That test quantifies the free thiols and therefore the remaining non-grafted peptide, which allows the grafted peptide density to be indirectly determined.

6.6.3.5 Dextran-VS blocking step

The peptide-grafted wells were rinsed in PBS and reacted with β -mercaptoethanol (50 mM in PBS, 150 μ L/well) for 1 hour at r.t. to block the remaining reacting sites (VS). The functionalized wells were then intensively rinsed: thrice in EtOH and thrice in PBS while sonicated for 5 min each. For sterilization purposes, EtOH (70% v/v in Milli-Q water, 150 μ L/well) was added into each well for 20 min at room temperature, which were then rinsed twice with PBS. At that point, the plate was filled with PBS and stored at 4°C for up to one day.

6.6.3.6 E5-VEGF capture

Prior to E5-VEGF capture, functionalized wells were blocked with FBS (10 % v/v in PBS, 150 μ L/well) for 1 hour at r.t. E5-VEGF solutions at concentrations ranging from 5 pM to 50 nM in FBS (10% v/v in PBS) were prepared and added to functionalized wells (100 μ L/well). After 3 hours, the E5-VEGF-containing supernatants were collected in a plate pre-blocked with FBS (10 % v/v in PBS), which was stored at -20°C until use. The functionalized wells were then rinsed thrice with PBS and directly used, either for a proliferation assay or for a characterization of E5-VEGF capture by direct ELISA.

Two types of ELISA were performed to characterize the E5-VEGF capture: a *direct* one of E5-VEGF-functionalized wells, and an *indirect* one on the E5-VEGF supernatants that were collected at the end of the capture. The indirect ELISA was performed as recommended by the manufacturer of the ELISA kit, along with a calibration curve to correlate E5-VEGF concentrations in solution. For the direct ELISA, all steps following VEGF capture in a standard ELISA were performed directly on the E5-VEGF-functionalized wells, as previously reported (Murschel et al., 2013).

Briefly, the wells were incubated in 100 μ L of biotinylated anti-VEGF₁₆₅ antibodies during 1 h, then in 100 μ L of horseradish peroxidase (HRP)-streptavidine conjugate for 1 h. The wells were then revealed using 100 μ L of substrate solution. The resulting absorbance at 450 nm was monitored on a Victor³ V Multilabel Counter from PerkinElmer Inc. (Woodbridge, ON) for 10 min (4 readings) and the slope (UA/min) was used as output data. Note that no calibration could be performed for the direct ELISA as it would require wells with known densities of VEGF.

6.6.4 Cell assays

6.6.4.1 Cell culture

Cell culture was performed in a standard humidified incubator at 37°C with 5% CO₂. HUVEC (resp. AoSMC) were maintained in EGM[®]-2 (resp. SmGM[®]-2) as recommended by the supplier. Medium was renewed every other day. For all tests, HUVEC (resp. AoSMC) were used between passages 3 and 5 (resp. 6 and 9). Note that EBM[®]-2 (or SmBM[®]-2) supplemented only with the antibiotics will be referred to as basal medium and EGM[®]-2 (resp. SmGM[®]-2) as complete medium.

6.6.4.2 Cell adhesion assay

HUVEC and AoSMC were seeded at 50 000 cells/cm² (equivalent to 16 000 cells/well) in 100 μ L of complete medium. After a 3h adhesion period, the wells were gently rinsed once with PBS and were further incubated in basal medium for 20 min at 37°C, to remove poorly adhered cells and proteins, as described by Zhu *et al.* (Zhu et al., 2001) Wells were then rinsed one more time with PBS. A resazurin assay was then directly performed at that point, as previously described (Noel et al., 2015). Fluorescence slopes derived from that metabolic assay were normalized to the value for aminated wells (used as a reference) within each independent assay. Those normalized values will be referred to as cell adhesion indices (CAI). Wells were then rinsed with PBS once and fixed in formaldehyde (4% w/v in PBS) for 30 min at room temperature.

6.6.4.3 Cell proliferation assay

Twenty-four hours prior to a proliferation assay, cells were serum-starved within the culture flasks with basal medium supplemented with FBS 0.5% v/v to induce a quiescent state, as advised by Staton *et al.* (Staton et al., 2009). Serum-starved HUVEC and AoSMC were seeded at 15 000

cells/cm² (equivalent to 4 800 cells/well) in starving medium on freshly prepared plates (right after E5-VEGF capture). After a 3h adhesion period, the wells were gently rinsed twice with PBS and either a resazurin assay was performed (D0 data) or each well was filled with proliferation medium. Unless mentioned otherwise in the figure captions, the latter corresponded to basal medium supplemented with 2% FBS, as well as acid ascorbic for HUVEC (all from Lonza). After 48 hours, a resazurin assay was performed on selected plates (D2 data) and media were renewed for the other ones. Two days later, a last resazurin assay was carried out (D4 data).

6.6.4.4 Cell imaging

F-actin and nuclei staining were performed on HUVEC- and AoSMC-covered wells. First, fixed cells were permeabilized with Triton X-100 (0.4 % v/v in PBS, 100 µL/well) for 10 min at r.t., and blocked with BSA (1% in PBS, 100 µL/well) for 1h, to prevent further non-specific adsorption of molecules. Actin fibers were stained thanks to Alexa Fluor 488-phalloidin (1:80 v/v in PBS, 50 µL/well), that was incubated for 1h at r.t. in the dark. Ten minutes before the end, 5 µL of DAPI (20 µg/mL in PBS) were carefully added to the 50 µL to stain the nuclei. Wells were then rinsed three times with PBS and observed using an AX10 Imager from Carl Zeiss Microscopy (Peabody, MA) under 365 and 470 nm excitations for DAPI and Alexa Fluor 488, respectively. Representative images were taken with the 10× objective.

6.6.5 Statistical analysis

As described in the figure captions, either a representative experiment was selected – where data are represented as means and standard deviations of the n replicates performed within the experiment – or all samples from N repeated experiments, each performed in n replicates, were used to calculate the means and standard deviations ($n \times N$). When mentioned in the corresponding figure captions, one- or two-way analysis of variance (ANOVA) was performed and a Bonferroni *post-hoc* test was used to identify significant mean differences at a 95% confidence level.

6.7 Results

6.7.1 Production of dextran-VS

Dextran of three molecular weights, namely 20 kDa, 40 kDa and 70 kDa, were modified with divinylsulfone (DVS) in alkaline conditions (25 to 100 mM NaOH in water). At such high pH, the hydroxyl groups are deprotonated and thus actively nucleophilic. As such, they will readily react with the electrophilic double bond of VS by 1,4-nucleophilic conjugate addition (Michael addition) to form a covalent bond (Figure 6-1A) (Yu & Chau, 2012). The reaction conditions (DVS:OH ratio, reaction time) were based on the works of Yu *et al.*, so as to avoid cross-linking between or within dextran chains and precipitation of modified dextran (Yu & Chau, 2012).

The degree of VS modification (%VS) was varied by changing the NaOH concentration (from 25 to 100 mM) and consequently the pH and O^- content dextran chains. The %VS was determined thanks to specific peaks of the 1H -NMR spectrum corresponding to the VS modification, as depicted on Figure 6-1. The %VS was found to be increasing in a linear fashion with the NaOH concentration used (Figure 6-1E). As expected, the %VS was independent of the dextran initial molecular weight for the conditions used. %VS ranging from 21.8 ± 0.8 to 59.1 ± 2.2 % of saccharide units was thus obtained for all molecular weights. The absence of cross-linking, that may have occurred during either synthesis or grafting (see below), was confirmed by molecular weight assessment by static light scattering (SLS) (data not shown).

6.7.2 Properties of grafted dextran-VS

To analyze the properties of a coating made of dextran-VS, commercial carboxylated culture plates were modified with an aminated polymer (PAAm) via carbodiimide chemistry (step 1 on Figure 6-2). PAAm grafting led to an amino group density of 2.9 ± 0.3 nmol/cm², as determined by an Orange II assay (Figure annexe - 7). Dextran-VS were then reacted with the available primary amine through some of their VS moieties, in alkaline conditions (pH 10, step 2 on Figure 6-2). The dextran-VS grafting was assessed by a decrease of the density of amino groups down to 0.5 ± 0.1 pmol/cm² (Figure annexe - 7) and was further confirmed by the cell-repelling properties of dextran.

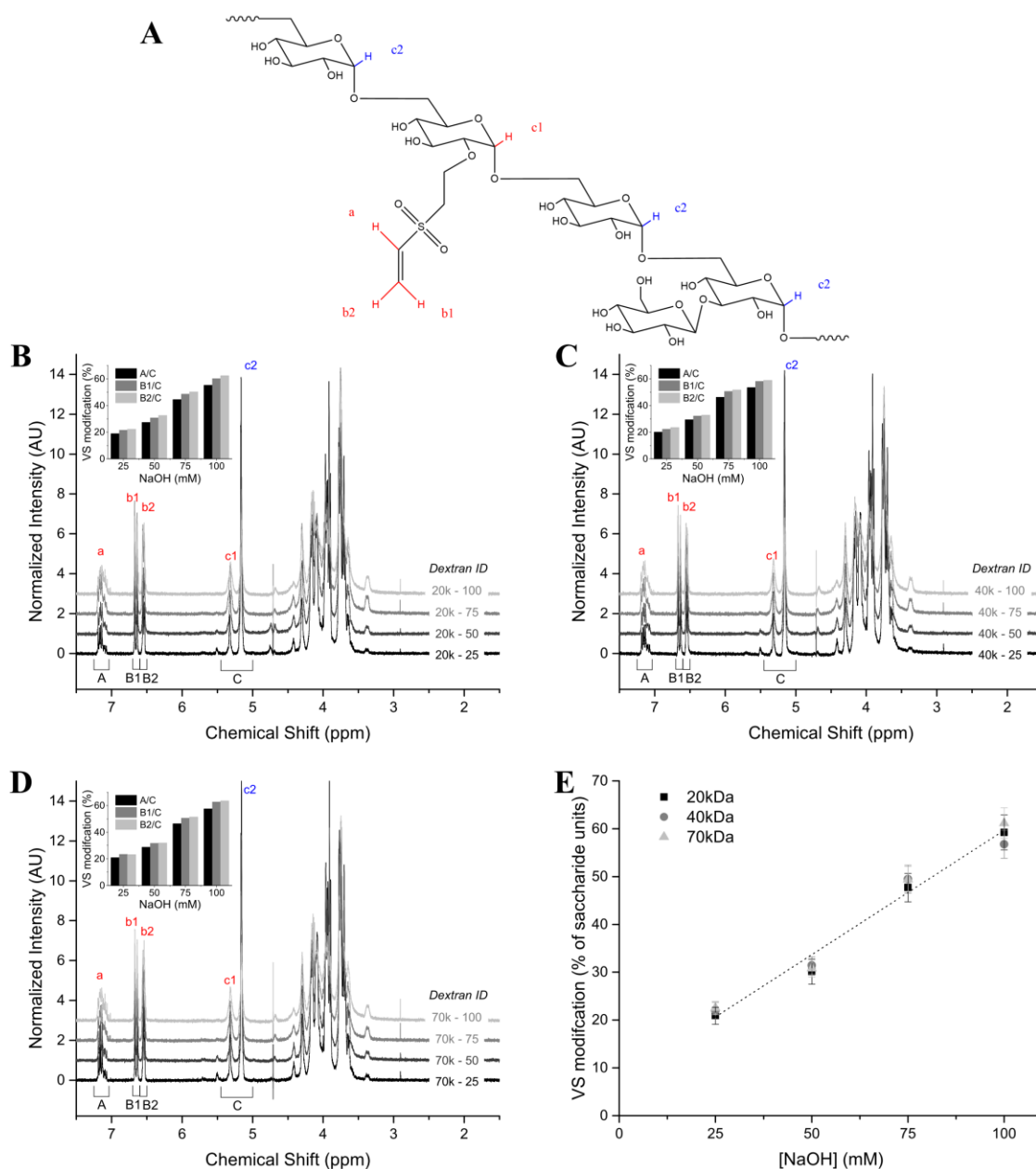


Figure 6-1. Production of dextran-vinylsulfone (dextran-VS). VS was added on dextran through the reaction of DVS in presence of 25 to 100 mM NaOH. VS-modified dextrans (A) with an initial molecular weight of 20 kDa (B), 40 kDa (C) and 70 kDa (D) were characterized through ^1H -NMR spectroscopy. The degree of VS modification was determined by integrating peaks a, b1 and b2 and comparing them to the number of saccharide units ($C = c1 + c2$, see insets on (B), (C) and (D)). As a summary, all calculated degrees of VS modifications are represented on (E) as a function of the NaOH concentration in the reaction mixture.

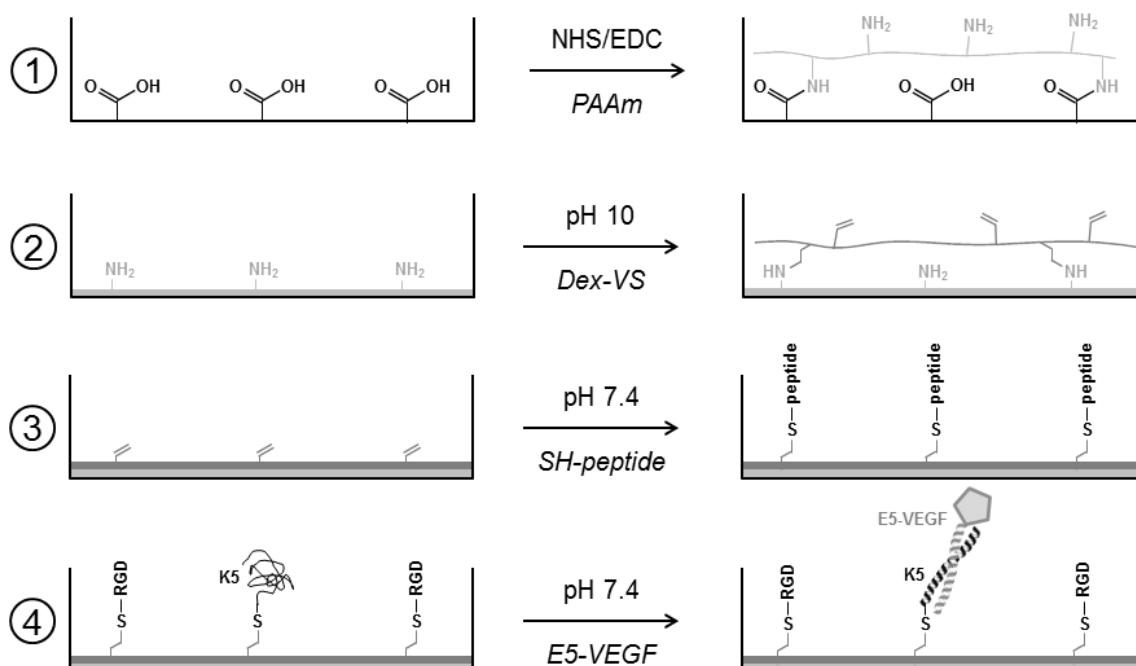


Figure 6-2. Biofunctionalization of carboxylated CellBIND® microplates. (1) Grafting of PAAm to carboxylated wells through carbodiimide chemistry; (2) Grafting of dextran-VS to aminated wells in alkaline conditions; (3) Grafting of peptides (e.g. K5 and RGD, successively) to VS-functionalized wells through Michael addition; (4) Tethering of E5-VEGF to K5-functionalized wells through K5/E5 capture.

HUVEC and AoSMC adhesion on the different dextran-coated wells were evaluated and compared to the adhesion level on the PAAm-coated wells (**Figure 6-3A**). For both cell types and all dextran-VS, cell adhesion was significantly lowered by the presence of dextran compared to PAAm (cell adhesion index (CAI) < 0.6). Besides, the higher the %VS (directly correlated with NaOH concentration used for synthesis, see **Figure 6-1E**), the lower the cell adhesion. Indeed, while low %VS (25 and 50 mM of NaOH) still allowed for some cell adhesion, especially for AoSMC, higher %VS (75 and 100 mM of NaOH) drastically decreased it. A two-way ANOVA, with molecular weight and NaOH concentration (i.e. %VS) as factors, revealed no statistical difference between the three molecular weights and between the two most alkaline conditions (75 and 100 mM of NaOH), for both cell types (**Figure 6-3A**). Accordingly, the 75-mM concentration (leading to a %VS of *ca.* 50% of saccharide units) was selected for further experiments.

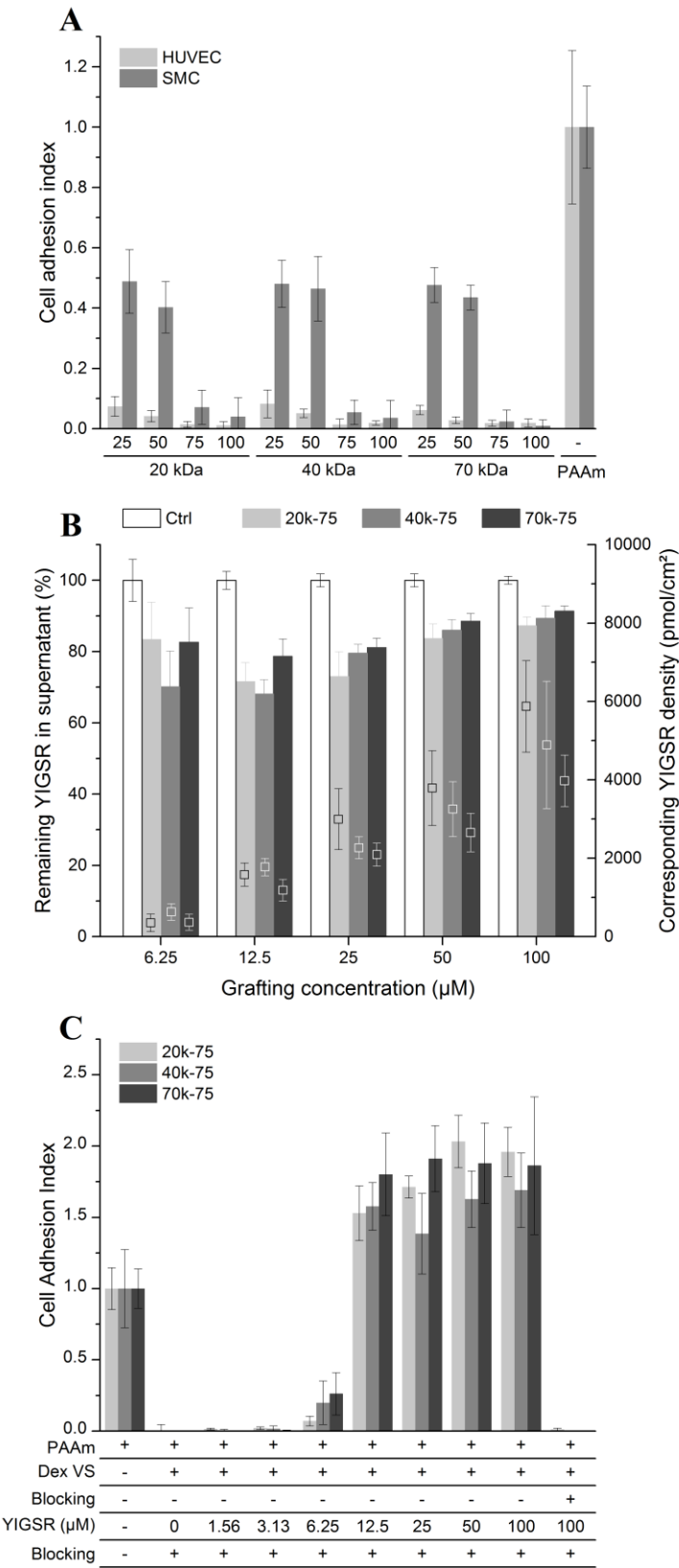


Figure 6-3. Properties of dextran-VS once grafted on microplates.

- (A) Cell-repelling properties of grafted dextran-VS as evaluated by a HUVEC and AoSMC adhesion assay. The x axis refers to our library of dextrans of three different molecular weights (20, 40 and 70 kDa) which were modified with DVS under different conditions (25, 50, 75 and 100 mM of NaOH). ($n=6$)
- (B) Availability of VS functionalities for peptide grafting. A range of YIGSR concentrations, going from 1.56 to 100 μM , was grafted onto wells covered with either dextran 20k-75, 40k-75 or 70k-75. At the end of the reaction, the remaining (non-grafted) peptides in the supernatant were quantified by Ellman's assay as described in the Methods section. All supernatant contents (gray bars) were significantly different from the corresponding grafting solution (Ctrl, white bars) ($p < 0.05$). Corresponding densities were calculated (empty squares), which values are to be read on the right axis. Note that YIGSR concentrations lower than 6.25 μM were below the detection limit of Ellman's assay. ($n=5$)
- (C) Availability of grafted peptides for cell interaction. HUVEC adhesion was evaluated on the YIGSR-functionalized wells for three dextran underlayers: 20k-75, 40k-75 and 70k-75. ($n=5$)

To further discriminate the different dextran-VS, molecular weight was kept as a variable to evaluate its influence on the availability of VS functionalities for peptide grafting (step 3 on Figure 6-2) and further cell interaction (Figure 6-3, B and C, respectively). For that part, the CGGYIGSR peptide was used, as it was observed that cell adhesion was very sensitive to its grafted density (Noel et al., 2015). YIGSR concentrations ranging from 1.56 to 100 μM were used for grafting on top of the three dextran-VS, i.e., 20k-75, 40k-75 and 70k-75.

The grafted density of YIGSR was first determined via an indirect method, by measuring the remaining peptide in the grafting solution through an Ellman's assay (Figure 6-3B). Some of the grafting concentrations used were out of Ellman's detection range (concentrations below 6.25 μM) and were not considered for that characterization. For concentrations higher than 6.25 μM , all supernatant contents were found to be significantly different from the control (grafting solution left in its original tube throughout the reaction). Corresponding densities were derived from those data (right axis Figure 6-3B), and went up to *ca.* 5 nmol/cm^2 , which was previously observed to be high enough for promoting HUVEC adhesion (Noel et al., 2015). As for cell-repelling properties

(**Figure 6-3A**), no obvious trend was observed when varying the dextran-VS molecular weight, with no drastic differences between the densities measured for a given peptide grafting concentration.

HUVEC adhesion assay was then performed on YIGSR-modified wells (**Figure 6-3C**) and was found to increase with grafted YIGSR density, from a CAI of *ca.* 0 to 1.75, for all dextran. A threshold-like behavior was observed, with no difference in shift-concentration between dextrans (6.25 μM of YIGSR). Those results suggested that YIGSR was presented in a similar fashion on all three dextran-VS (20k-75, 40k-75 and 70k-75). Therefore, the dextran-VS 70k-75 was arbitrarily selected for the following experiments. Interestingly, when 100 μM of YIGSR was incubated on top of pre-blocked dextran-modified wells (rightmost columns on Figure 6-3C), no HUVEC adhesion was observed, as for the control without peptide. Those results attested for the specificity of our covalent peptide grafting strategy and highlight the relevance of using low-fouling dextran for this type of study.

6.7.3 Peptide immobilization

Wells were first coated with PAAm and subsequently with the selected dextran-VS 70k-75 and several peptide sequences that were previously shown to enhance HUVEC adhesion (Figure 6-2). Those are RGD and its control RGE (Chollet et al., 2009; Noel et al., 2015), YIGSR and its control SGIYR (Jun & West, 2005; Noel et al., 2015), as well as REDV (Lin et al., 2012) and CAG (Kanie et al., 2012). Grafting concentrations ranging from 1.56 to 100 μM were used for all peptides, leading to similar densities for all peptides, from below 0.2 nmol/cm^2 (undetectable by our assay) up to *ca.* 4 nmol/cm^2 (see Figure 6-3B for YIGSR on 70k-75 and Figure annexe - 8 for all peptides).

6.7.4 Cell adhesion on peptide-functionalized wells

HUVEC and AoSMC adhesion was evaluated on those peptide-functionalized wells (Figure 6-4). Despite of the cell-repelling properties of dextran, the well-known RGD peptide was able to enhance effectively both HUVEC and AoSMC adhesion, from the smallest peptide concentration used (1.56 μM , Figure 6-4A). Such a result is not surprising as other groups have already reported an RGD effect on cell adhesion at very low densities (10^{-4} nmol/cm^2 (Le Saux et al., 2011), 10^{-6} nmol/cm^2 (Massia & Hubbell, 1991)). CAI varied from *ca.* 0 on dextran up to 1 and higher (*ca.* 1.75 for HUVEC and 1.25 for AoSMC) on RGD-functionalized samples. Unlike for PAAm-coated

samples, cell adhesion on RGD-functionalized wells was most probably mediated through integrin since substituting RGD by RGE was sufficient to abrogate adhesion for both cell types (Figure 6-4D).

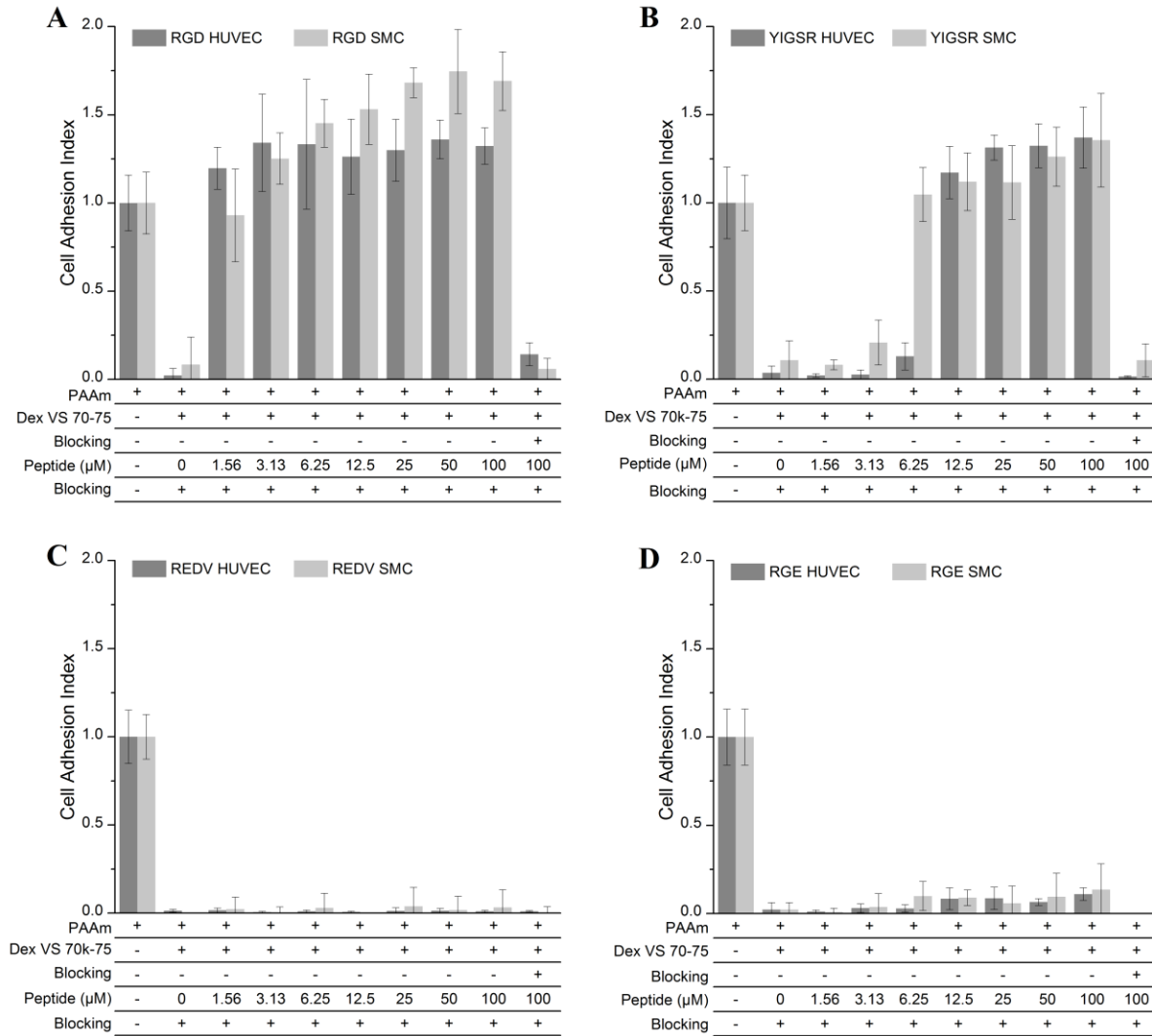


Figure 6-4. HUVEC and AoSMC adhesion on peptide-functionalized wells. Different cell-adhesive peptides, namely (A) RGD; (B) YIGSR ; (C) REDV ; as well as (D) RGE were grafted onto wells covered with dextran-VS 70k-75. As specified in the x axis (table), a range of concentration going from 1.56 to 100 μ M of peptide was used for the grafting step. A control was added with 100 μ M of peptides incubated on top of pre-blocked dextran, to check for non-specific adsorption (rightmost columns on the figures). HUVEC and AoSMC adhesion were

evaluated through a resazurin assay, which data were normalized to the adhesion level on PAAm-coated wells (without dextran). ($n=5$)

Our second sequence of interest, namely YIGSR, was also able to induce both HUVEC and AoSMC adhesion, providing it was grafted at a sufficient density (Figure 6-4B). A threshold-like behavior was indeed observed for both cell types, with the CAI going from not significant to a plateau value with a 4-fold increase of grafting concentration (3.13 to 12.5 μM for HUVEC and from 1.56 to 6.25 μM for AoSMC). Interestingly, the shift in HUVEC adhesion occurred at a YIGSR density of *ca.* 0.4 nmol/cm² (6.25 μM of YIGSR). That value was in very good agreement with recent results obtained on aminated PET films that were modified with YIGSR through a PEG spacer where a similar trend was observed with a threshold YIGSR density in the 0.2 – 2 nmol/cm² range (Noel et al., 2015). Nevertheless, the YIGSR role on adhesion did not seem to depend on the primary sequence of the peptide, since the exact same observations could be made for the SGIYR sequence (Figure annexe - 9 and Figure annexe - 10).

Finally, REDV- and CAG-functionalized wells failed to enhance cell adhesion, for both HUVEC and AoSMC (Figure 6-4C and Figure annexe - 11). Such a result was already observed for HUVEC adhesion on PET films functionalized with REDV via a PEG linker, where we hypothesized that the peptide presentation and/or its density were inappropriate for cell response (Noel et al., 2015).

As a summary, RGD, YIGSR and SGIYR were able to enhance both HUVEC and AoSMC adhesion, whereas REDV and CAG failed to enhance any cell adhesion similarly to our control sequence RGE. Those adhesion results were further confirmed by cell imaging (Figure 6-5 and Figure annexe - 10), for wells functionalized with *ca.* 1 nmol/cm² of peptides. On the one hand, on RGD-, YIGSR- and SGIYR-functionalized wells, HUVEC and AoSMC appeared numerous, largely spread with well-defined actin fibers, suggesting a good adhesion to the substrate. On the other hand, on RGE- and REDV-functionalized wells, the very sparse cells presented a round morphology and very few stress fibers, confirming the low affinity of cells for pristine, REDV- and RGE-decorated dextran. Altogether, none of the tested peptides demonstrated any HUVEC specificity over AoSMC. Therefore, the following assays were performed with the RGD peptide, at a grafting concentration of 10 μM .

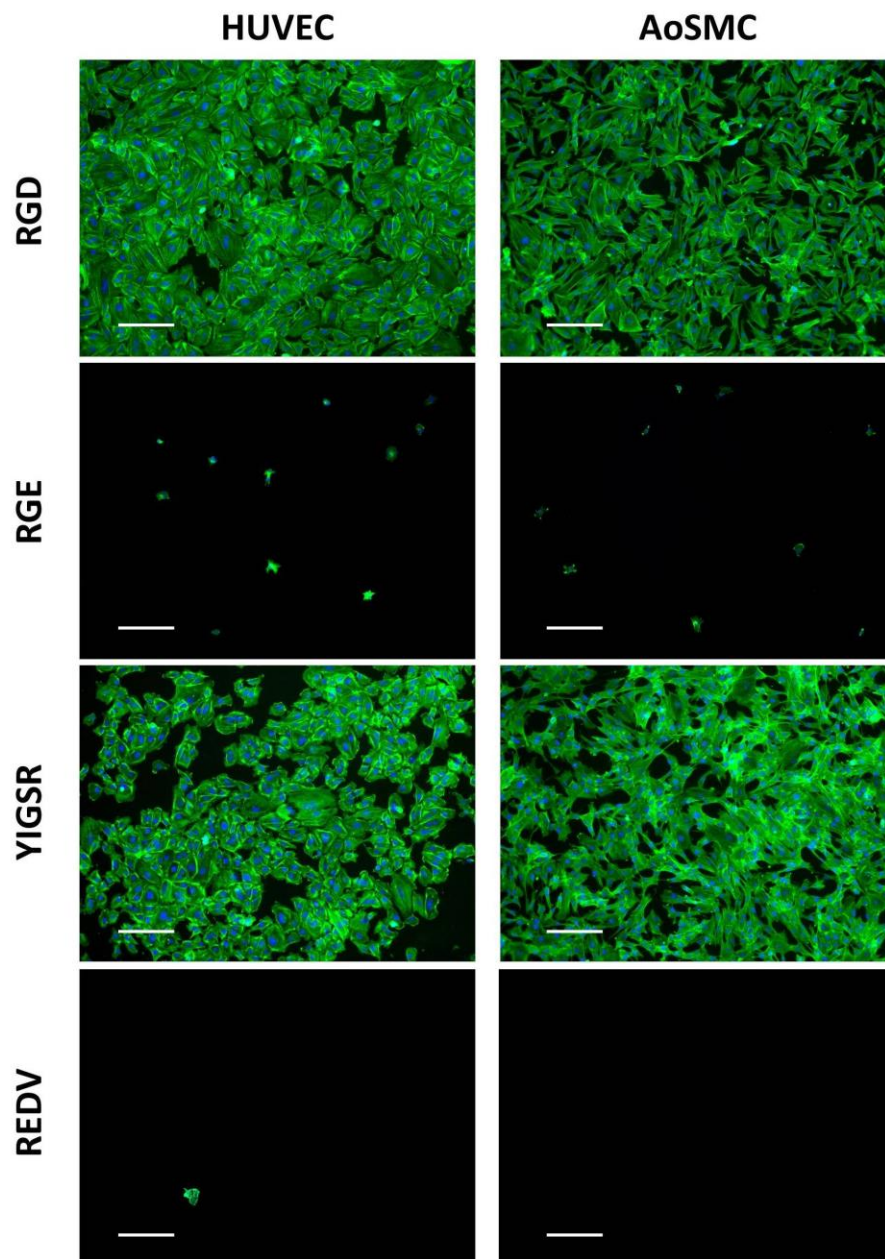


Figure 6-5. HUVEC and AoSMC adhesion on peptide-functionalized wells. The images correspond to the results presented on Figure 6-4 for peptides grafted at a concentration of 12.5 μM , leading to *ca.* 1 nmol/cm². Actin and nuclei staining are shown in green and blue, respectively. Scale bar represents 200 μm .

6.7.5 E5-VEGF and RGD co-immobilization

Prior to RGD grafting, the K5 peptide was incubated in wells covered with dextran 70k-75 to allow subsequent E5-VEGF capture (steps 3 and 4 on Figure 6-3). The K5 grafting could not be characterized with the indirect Ellman's assay, as for RGD, due to the K5 peptide tendency to dimerize and form disulfide bonds (Litowski & Hodges, 2001). Therefore, the priority was put on K5 over RGD considering that (1) the K5 grafting yield would most likely be lower than the one of RGD due to its larger size and its oxidation and that (2) the RGD density is not a critical parameter over the tested range of densities (Figure 6-4-A). Moreover, K5 immobilization (at 1 μ M) did not affect the subsequent grafting of RGD (at 10 μ M), which resulting density remained of 1.0 ± 0.3 nmol/cm² (data not shown) as for conditions without K5 (see Figure 6-3B or Figure annexe - 8).

E5-VEGF was then added to wells functionalized with K5, RGD or both. An additional control was used with dextran-coated wells that were blocked before any peptide grafting ("K5+RGD"). As shown on Figure 6-6, a direct assessment of the E5-VEGF capture on the various surfaces was performed through a direct ELISA (Figure 6-6A). That method, although not quantitative, was very sensitive and allowed to detect small quantities of captured E5-VEGF (below 1 fmol/cm²). Over the tested range of concentrations (from 50 pM to 50 nM of added E5-VEGF), non-specific adsorption of E5-VEGF was fully prevented on wells where K5 had not been grafted ("RGD" condition), highly suggesting that E5-VEGF capture occurred via coiled-coil interactions as well as highlighting once again the protein-repelling properties of the dextran-coating. When K5 was covalently grafted to dextran-coated wells ("K5" and "K5+RGD" conditions), the ELISA signal increased with the E5-VEGF concentration, and reached a maximal value from 50 pM of incubated E5-VEGF (*ca.* 0.1 UA/min). Those results confirmed the K5 grafting as well as the high affinity and specificity of the K5/E5 interaction. Besides, no differences were observed between the "K5" and "K5+RGD" conditions, indicating that the presence of RGD within the coating did not affect the E5-VEGF capture by grafted K5. Comparing the "(K5+RGD)" and "K5+RGD" conditions, our results indicated some non-specific adsorption of the K5 peptide that was able to recruit some E5-VEGF. This recruitment was however always lower than for both "K5" and "K5+RGD" conditions, and the maximal signal (0.07 ± 0.01 UA/min) corresponding to 50 nM of E5-VEGF was still lower than the one with covalently grafted K5 and 50 pM of E5-VEGF only. That comparison indicated

that the yield of E5-VEGF capture on non-specifically adsorbed K5 was less than 1 000 times lower than on covalently grafted K5.

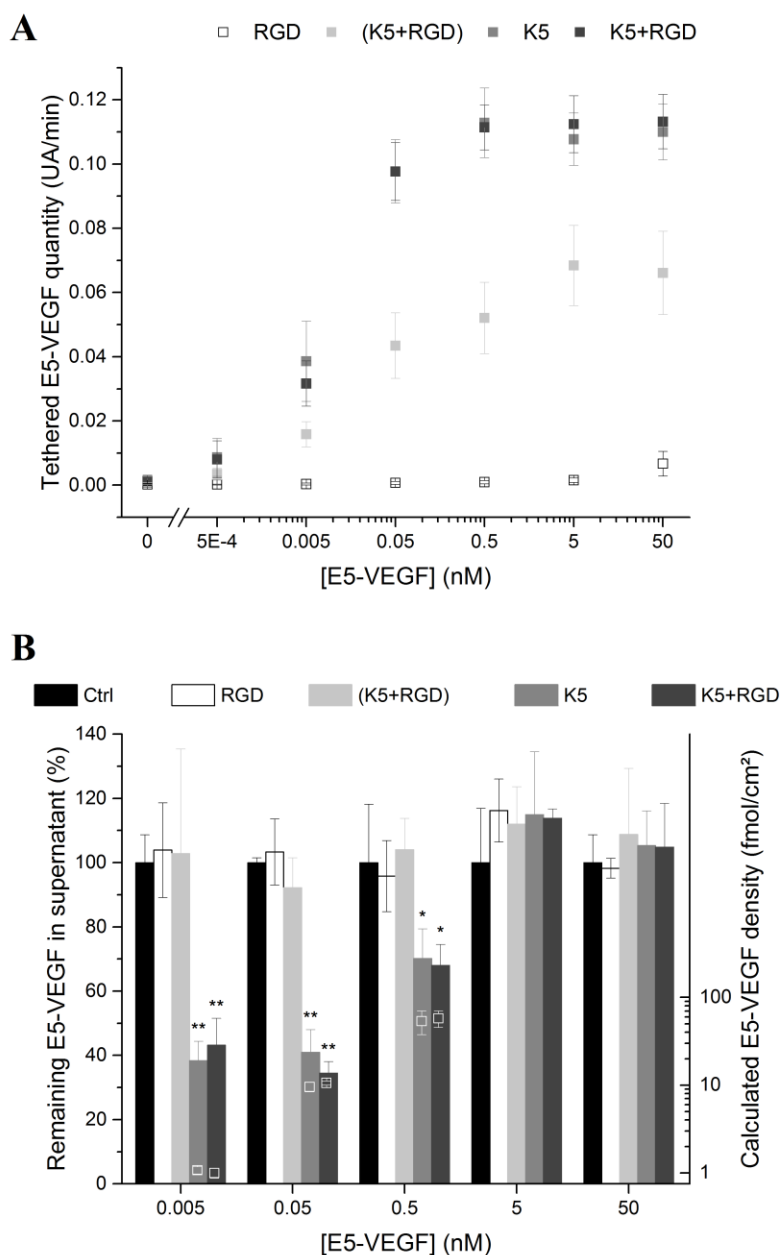


Figure 6-6. Characterization of E5-VEGF capture on functionalized wells. All wells were functionalized with PAAm and subsequently with dextran-VS 70k-75. Wells were then reacted with either the K5, RGD, or both successively. Various concentrations of E5-VEGF, from 0.5 pM to 50 nM, were then incubated on the functionalized wells. The “(K5+RGD)” condition corresponds to pre-blocked dextran-VS, representing the non-specific adsorption of K5 and RGD. E5-VEGF capture was evaluated through two methods:

(A) Direct ELISA ($N=2 \times n=4$)

(B) Indirect ELISA : Corresponding E5-VEGF densities (empty squares, to be read on the right axis) were derived from those data, only when the supernatant content was different from the control solution (denoted * for $p<0.05$ and ** for $p<0.005$). The lowest concentration (0.5 pM) is not represented as it was below the ELISA detection limit. ($n=4$)

To quantitate E5-VEGF densities, an indirect ELISA was then performed (Figure 6-6B) on the supernatants so as to measure remaining free E5-VEGF. For all concentrations, the supernatants of the “RGD” and “(K5+RGD)” conditions were not significantly different from the control (initial E5-VEGF solution), confirming that there was no non-specific adsorption of E5-VEGF in the absence of K5 and that the non-specific adsorption of K5 lead to negligible recruitment of E5-VEGF. The supernatant contents of “K5” and “K5+RGD” conditions were always similar, for all concentrations, confirming that RGD did not hinder the E5-VEGF capture by grafted K5. Of interest, a capture yield of *ca.* 60% was obtained for 5 pM- and 50 pM-incubation solution, leading to *ca.* 1 and 10 fmol/cm² of E5-VEGF, respectively. The capture yield was lower for the 500 pM concentration (*ca.* 30%, leading to *ca.* 50 fmol/cm² of E5-VEGF), and became undetectable for higher concentration (5 nM and 50 nM). Those results correlated well with the saturation observed with the direct ELISA (Figure 6-6A). Note that such a density corresponds to one VEGF molecule per 3.3×10^3 nm², that is 3×10^5 VEGF molecules per cell (considering a spread cell area of 1×10^3 μm² (Noel et al., 2015)). Providing adequate VEGF presentation, that density was considered sufficient, given that a recent study reported that HUVEC harbor *ca.* 5 000 VEGFR-2/cell (Imoukhuede & Popel, 2011).

6.7.6 Cell proliferation

HUVEC and AoSMC proliferation was then evaluated on RGD- and E5-VEGF-functionalized wells (Figure 6-7). Cells were grown in medium containing 2% FBS (v/v) without any growth factor supplement as well as in E5-VEGF-supplemented and complete medium as controls. A convenient metabolic assay was used rather than viable cell counting, as both assays were previously shown to correlate well (Noel et al., 2015). For both cell types, only RGD-harboring wells enabled cell adhesion (D0 data), regardless of the presence of co-captured E5-VEGF, which indicated that, at these densities, VEGF had no effect on cell adhesion.

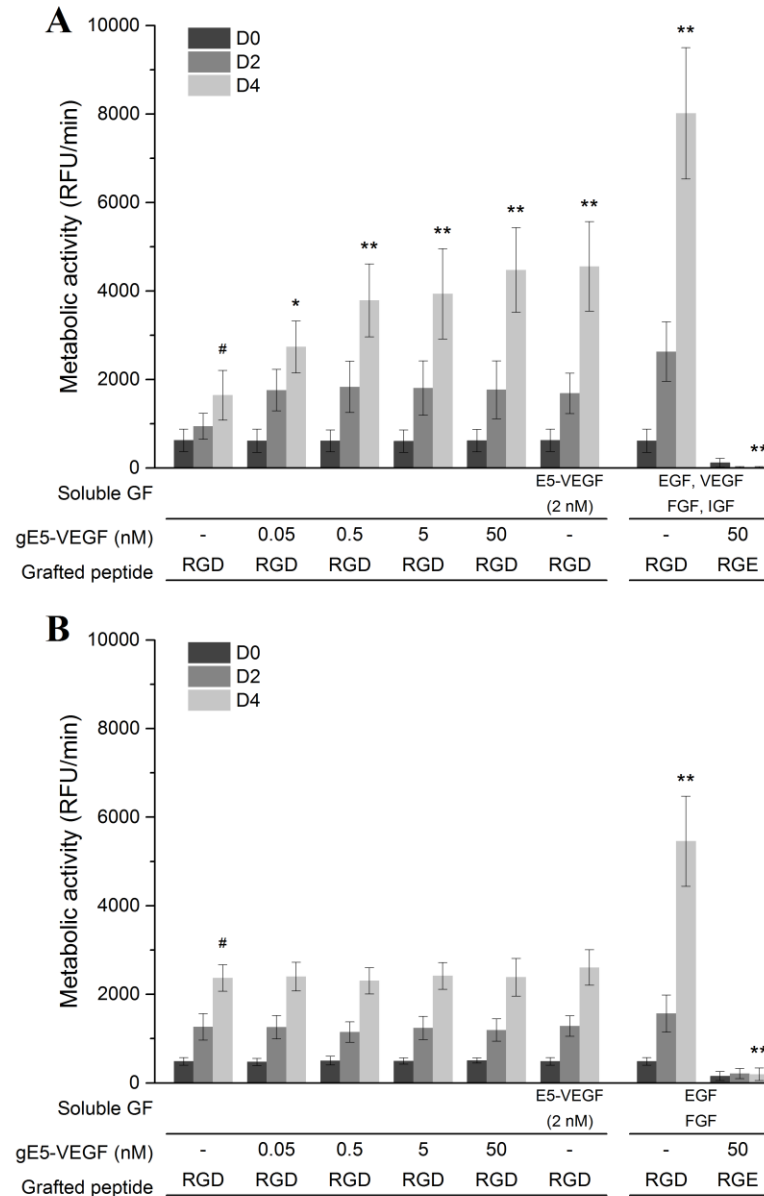


Figure 6-7. (A) HUVEC and (B) AoSMC proliferation on wells functionalized with both RGD and E5-VEGF, as determined by a resazurin assay. RGD (or RGE) was grafted at 10 μ M, leading to *ca.* 1 nmol/cm² and E5-VEGF was captured at concentrations ranging from 50 pM to 50 nM, as mentioned on the table axis. Growth medium was GF-free for most conditions, and supplemented with soluble E5-VEGF at 2 nM for comparison with grafted E5-VEGF. On both figures, the rightmost two columns corresponded to complete medium. All datasets were compared with the control without E5-VEGF (denoted #) at D4, thanks to a one-way ANOVA and are denoted * for $p < 0.05$ and ** for $p < 0.005$. ($N = 3 \times n = 5$)

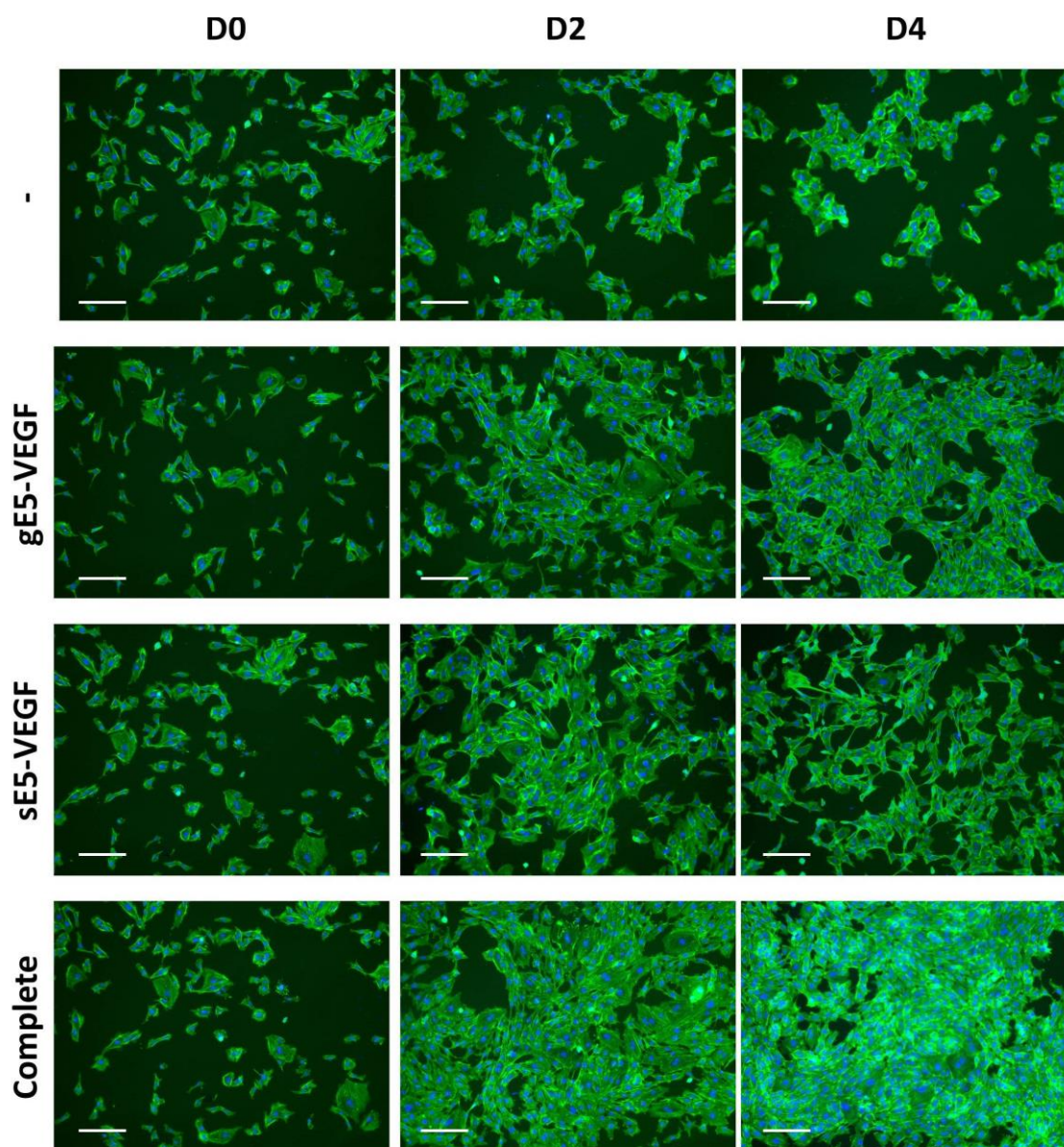


Figure 6-8. HUVEC proliferation on functionalized wells. The images correspond to the results presented on Figure 6-7A for HUVEC grown in GF-free medium on wells that were functionalized with RGD alone (first line) or with both RGD and E5-VEGF at 5 nM (second line). Controls are shown for HUVEC grown in medium supplemented with soluble E5-VEGF (2 nM, third line) or in complete medium (fourth line) on RGD-functionalized wells. Actin and nuclei staining are shown in green and blue, respectively. Scale bar represents 200 μm.

HUVEC were able to proliferate at higher rates on E5-VEGF-functionalized wells (also harboring RGD) compared to wells functionalized with RGD only (Figure 6-7A). When E5-VEGF was captured, at any concentration, differences in metabolic activities were already significant from D2 (*ca.* 2 fold compared to RGD alone), and remained so at D4 (*ca.* 3 fold compared to RGD alone). Those results were further complemented by cell imaging (Figure 6-8), where cell number can be qualitatively compared, leading to the same conclusions: the ability of captured E5-VEGF to induce HUVEC proliferation.

In addition, no significant differences were observed when E5-VEGF was grafted at 500 pM or at higher concentrations (Figure 6-7A), confirming the surface saturation with E5-VEGF we previously observed (Figure 6-6). Interestingly, no differences were observed between grafted E5-VEGF (at 500 pM and higher) and soluble E5-VEGF (2 nM, equivalent to 90 ng/mL of 45-kDa VEGF₁₆₅). That concentration was chosen to lead to the maximal VEGF response, based on previous studies (Murschel et al., 2013). Therefore, captured E5-VEGF was able to reach that maximal response as well, with an even lower quantity of VEGF since 50 fmol/cm² amounts to 150 pM (vs 2 nM). Besides, the soluble E5-VEGF was renewed every other day, unlike the captured E5-VEGF that enabled a sustained proliferation response. Those results highly suggest that the E5/K5 capture was strong enough to prevent VEGF internalization while ensuring its bioactivity, as previously observed (Murschel et al., 2013).

On the other hand, AoSMC proliferation was not affected by the presence of E5-VEGF at the well surfaces (Figure 6-7B). Indeed, no significant differences neither at D2 nor at D4 between no E5-VEGF, grafted E5-VEGF (at any concentration) and soluble E5-VEGF were observed. AoSMC proliferation was promoted only in complete medium, containing FGF and EGF, two growth factors known to be involved in growth mechanisms of SMC, unlike VEGF (Berk, 2001).

6.8 Discussion

We here present a biofunctionalization strategy aiming at both selectivity and multifunctionality. In this manuscript, we applied it to the development of a vascular graft coating, requiring adhesive and proliferative cues for endothelial cells. Such a targeting of one cell type entails the use of selective biomolecules as well as a bio-inert underlayer onto which they can be grafted. The strategy, depicted on Figure 6-3, was to use a low-fouling background (dextran) displaying versatile moieties (VS) for subsequent grafting of selective biomolecules (peptides and growth factors).

The very first step of the functionalization strategy, i.e. the PAAm grafting, was previously applied to more realistic substrates for implants (*i.e.* PET films (Noel et al., 2015) and nonwoven mats (Noel et al., 2013)). Therefore, even though microplates were used in this study for simplicity's sake, this coating would be easily transferred to relevant polyester materials.

6.8.1 Dextran coating

Dextran was chosen as an interesting candidate to achieve the required cell- and protein-repelling properties of the underlayer. The low-fouling properties of dextran, similar to the ones of well-known PEG coatings, involve both physical (steric hindrance, entropy) and chemical (interaction with water molecules) aspects (Martwiset et al., 2006). Dextran coatings had been shown to be more efficient in repelling proteins when adopting a highly hydrated “loops and trains” conformation at the surface (Martwiset et al., 2006; Österberg et al., 1993). The multiple anchor points needed to get such a coating had often been achieved through dextran carboxymethylation (McArthur et al., 2000; Monchaux & Vermette, 2008). However, the negative charge of carboxymethylated dextran adds another bias, than can lead to adsorption of positively charged protein domains through electrostatic interactions (McArthur et al., 2000; Monchaux & Vermette, 2008). Accordingly, in the present study, dextran was decorated with neutral VS moieties for both grafting onto substrate and further biomolecule immobilization.

The low-fouling properties (towards both cells and proteins) of dextran-VS coatings were tested through a cell adhesion assay of two cell types in serum-containing medium. Similarly to previous studies, a low degree of moieties (here VS) probably resulted in a low pinning density of dextran chains, with an incomplete coverage of the underlying aminated layer and an inadequate tail-like

conformation (Martwiset et al., 2006). Therefore, our two lowest degrees of VS modification were inefficient to repel cells, especially AoSMC (Figure 6-1E and Figure 6-3A). When increasing the degree of VS modification, a full coverage and adequate dextran conformation were most likely obtained, which is supported by both HUVEC and AoSMC being efficiently repelled from our dextran-VS coatings. Interestingly, a conjugation degree of *ca.* 50% of saccharide units was needed to reach those low-fouling properties, which was in very good agreement with previous studies (Martwiset et al., 2006).

6.8.2 Adhesive peptides and cell selectivity

In this report, RGD/RGE functionalization of dextran-coated wells served as a proof of principle that integrin-mediated adhesion could be aimed at on low-fouling substrates through the grafting of relevant peptide sequences. RGD-functionalized wells proved indeed successful in specifically enhancing cell adhesion, as compared to RGE-functionalized wells (Figure 6-4, A vs D). However, RGD is a ubiquitous sequence and therefore does not selectively target endothelial cells, as shown here and in other reports (Hubbell et al., 1991; Noel et al., 2015).

Three peptides derived from ECM proteins were tested as potential candidates for a selective recruitment of EC: YIGSR, REDV and CAG (Noel et al., 2015; Ren et al., 2015). The YIGSR sequence was previously reported to offer EC-selectivity over SMC, be it in adhesion (Taite et al., 2008) or in migration (Fittkau et al., 2005) assays. However, in the present study, YIGSR unselectively promoted adhesion of both HUVEC and AoSMC. Interestingly, Hubbell *et al.* reported conflicting results regarding YIGSR selectivity, depending on the substrate and grafted density (Hubbell et al., 1991). Thus, the YIGSR selectivity may not be systematic in all functionalization constructs.

The REDV sequence, often observed as EC-selective (Ceylan et al., 2011; Hubbell et al., 1991; Lin et al., 2012), failed to enhance HUVEC adhesion in two of our constructions: (1) PET films that were functionalized with REDV through a PEG spacer (Noel et al., 2015) and (2) carboxylated microplates that were functionalized with REDV through dextran-VS as a linker (present study). As those strategies were quite different, it seems that an unidentified bias remains to explain the REDV failure. The absence of REDV receptors ($\alpha_4\beta_1$ integrins) at the surface of our cells seems unlikely as cells came from pooled sources. Interestingly, Monchaux *et al.* suggested that the low-fouling substrates could prevent REDV from inducing EC adhesion on its own (Monchaux &

Vermette, 2007). Such a bias, among others (e.g. various substrates and grafted densities), could explain the surprising discrepancy between reports using the REDV sequence as previously discussed (Noel et al., 2015).

Finally, the tripeptide CAG was very recently found, through an elegant screening assay of collagen type IV, to be highly selective for EC over SMC (Kanie et al., 2012; Kuwabara et al., 2012). Since its identification, CAG has been used by one other group, interestingly reporting no platelet attachment to CAG-grafted substrates (Khan et al., 2015). In the present study, CAG failed to induce any cell adhesion (Figure annexe - 11). The grafting strategy could be questioned here, but a similar thiol-based capture was performed in a previous report (Khan et al., 2015). Similarly to REDV, CAG alone may not be sufficient to induce EC adhesion onto a low-fouling substrate. Besides, as only two groups have so far used this sequence, more investigations would be needed to elucidate how CAG mediates EC adhesion.

Altogether, our adhesion results enrich the debate about whether short peptide sequences should be used within biomaterials to ensure efficient and selective cell response (Collier & Segura, 2011). While none of the tested peptides (RGD, YIGSR, REDV and CAG) was selective for EC over SMC, our dextran-based set up enabled an unbiased discrimination between sequences reported as adhesive and could readily be used with newly discovered candidates.

6.8.3 VEGF immobilization

In the present study, VEGF₁₆₅ was immobilized through use of the K5/E5 capture system, which had previously been proved efficient for the oriented immobilization of bioactive growth factors (Liberelle et al., 2010; Murschel et al., 2013). A density of 50 fmol/cm² – which corresponds to 2.25 ng/cm² of 45-kDa VEGF₁₆₅ (Ferrara et al., 2003) – was sufficient to induce HUVEC proliferation to the same extent as soluble VEGF (Figure 6-7A et Figure 6-8).

The vast majority of reported VEGF densities are in the range of 25-200 ng/cm² (Backer et al., 2006; Hu et al., 2012; Luo et al., 2013; Poh et al., 2010; Shin et al., 2012; Yu et al., 2012) or higher (700-850 ng/cm²) (Guex et al., 2014; Leslie-Barbick et al., 2009). Some of those reports showed no significant difference with their controls when VEGF was grafted at 20 ng/cm² and below (Backer et al., 2006; Galas & Liu, 2014; Shin et al., 2012), that is 10 times higher than 2.25 ng/cm². In contrast with our strategy, all the aforementioned studies performed the VEGF immobilization

through adsorption on PS (via fibronectin (Fn) conjugation (Backer et al., 2006) or Fc tag addition (Yu et al., 2012)) or through covalent grafting via the amino group of Lys side-chains (Guex et al., 2014; Hu et al., 2012; Luo et al., 2013; Poh et al., 2010; Shin et al., 2012). As stated in the introduction, that last strategy presents many flaws that may have led to reduced bioactivity of grafted VEGF, if any, when compared to its native conformation (heparin-adsorbed or soluble) (Anderson et al., 2009; Galas & Liu, 2014; Hu et al., 2012).

Anderson *et al.* uniquely reported a low VEGF density of 0.1 ng/cm² that was able to induce EC proliferation as well as VEGFR-2 phosphorylation (Anderson et al., 2009). In that study, the authors elegantly grafted VEGF through photo-immobilization following VEGF adsorption on heparin-coated substrates, thereby providing VEGF with an appropriate orientation. Altogether, we believe that an oriented immobilization – such as the one resulting from our capture system or via heparin-mediated capture – is required for VEGF to be effectively bioactive at low grafting densities.

6.8.4 Co-immobilization of peptides and VEGF

The co-immobilization of RGD and VEGF on our dextran-based coating was carried out in order to take advantage of both adhesive and proliferative cues for endothelial cell colonization. RGD and VEGF have been used together within PEG hydrogels *in vitro* (Leslie-Barbick et al., 2009; Porter et al., 2011a) and *in vivo* (Phelps et al., 2013; Zisch et al., 2003), with encouraging results for enhanced tissue vascularization. However, to our knowledge, co-immobilization of ECM peptides and GFs had hardly been employed in the past for endothelialization purposes. In a few reports, RGD had been co-immobilized with other growth factors (e.g. bFGF (Lee et al., 2012) and insulin (Hatakeyama et al., 2006)) leading to synergistic effects on both adhesion and proliferation of endothelial cells. Similarly, VEGF had been co-immobilized with fibronectin (Fn), showing synergistic effect on EC adhesion and spreading (Traub et al., 2013) as well as on EC proliferation and migration (Taguchi et al., 2000). Some unexpected results were however reported in those manuscripts, where the authors hypothesized that VEGF could have been hindered by Fn within their chimeric construct (Taguchi et al., 2000), or that VEGF interfered with the adhesive role of Fn when co-grafted (Traub et al., 2013). Those observations highlight once again the importance of appropriate protein presentation as well as of thorough grafting characterization (e.g. densities).

Interestingly, there is evidence for a crosstalk between VEGFR-2 and many RGD-binding integrins (Byzova et al., 2000; Eliceiri, 2001; Le Saux et al., 2011; Traub et al., 2013), which could lead to a synergistic action between VEGF and RGD. For example, Le Saux *et al.* reported an enhanced EC response to soluble VEGF depending on the RGD presence and grafted density (Le Saux et al., 2011). In the present study, we have successfully grafted both RGD and VEGF at high densities (*ca.* 1 nmol/cm² and 50 fmol/cm², respectively) and VEGF grafting did not interfere with RGD-mediated HUVEC adhesion. Whether RGD and VEGF acted synergistically could not be confirmed here as RGD was required for initial cell adhesion. Nevertheless, the additive effect of the adhesive RGD and proliferative VEGF was beyond any doubt (Figure 6-7A and Figure 6-8).

6.8.5 Endothelialization vs hyperplasia

Failure of vascular implants has been correlated with incomplete endothelialization and neointimal hyperplasia that is the over-proliferation of SMC in response to implantation and/or injury (Curcio et al., 2011; Melchiorri et al., 2013). To overcome hyperplasia, anti-proliferative drugs (e.g. sirolimus and paclitaxel) have been incorporated into stents. However, those drugs are not SMC-selective and limit the proliferation of EC as well (Curcio et al., 2011), once again illustrating the need for selective biomolecules as recently reviewed (Ren et al., 2015). The action of VEGF is believed to be EC-selective (Matsuda et al., 2013), as SMC do not harbor VEGFR-2 (Asahara et al., 1995; Berk, 2001). Besides, there is evidence suggesting that VEGF could hinder SMC proliferation through the production of key biomolecules (e.g. NO) by EC (Asahara et al., 1995; Crombez et al., 2005; Dorafshar et al., 2003; Zachary et al., 2000; Zisch et al., 2001). Altogether, VEGF-mediated proliferation of EC could both improve endothelialization while limiting, or at least not favoring, SMC proliferation.

In the present study, VEGF proved efficient in selectively mediating HUVEC proliferation, as compared to AoSMC (Figure 6-7). However, co-culture assays would be needed to further evaluate the VEGF-induced production of biomolecules by EC (e.g. NO, TGF- β), and their role on SMC proliferation.

6.9 Conclusion

A dextran-based coating was developed for the efficient immobilization of various biomolecules on top of a low-fouling underlayer. As an example, ECM peptides and VEGF were co-immobilized, aiming at both selective adhesion and proliferation of endothelial cells for vascular applications. First, a library of dextrans was modified with VS moieties for grafting on aminated substrates as well as for subsequent tethering of biomolecules. Some dextran coatings featured the sought low-fouling properties and were efficiently modified with biomolecules. Among the tested adhesive peptides (RGD, YIGSR, REDV and CAG), only RGD and YIGSR were able to effectively promote cell adhesion, although not selectively for HUVEC over AoSMC. Nevertheless, VEGF selectively promoted HUVEC proliferation when co-immobilized with RGD. Altogether, both adhesive and proliferative cues could be incorporated in our construct, which could find many applications in tissue engineering and regenerative medicine.

6.10 Acknowledgments

This work was supported by the Fonds de recherche du Québec – Nature et technologies (S.N.), the Natural Sciences and Engineering Council of Canada, and the Canada Research Chair Protein-enhanced Biomaterials (G.D.C.). We would like to thank S. Bilodeau for NMR measurements.

6.11 References

- Anderson, S. M., Chen, T. T., Iruela-Arispe, M. L., & Segura, T. (2009). The phosphorylation of vascular endothelial growth factor receptor-2 (VEGFR-2) by engineered surfaces with electrostatically or covalently immobilized VEGF. *Biomaterials*, 30(27), 4618-4628. doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.05.030
- Asahara, T., Bauters, C., Pastore, C., Kearney, M., Rossow, S., Bunting, S., . . . Isner, J. M. (1995). Local delivery of vascular endothelial growth factor accelerates reendothelialization and attenuates intimal hyperplasia in balloon-injured rat carotid artery. *Circulation*, 91(11), 2793-2801. doi: 10.1161/01.CIR.91.11.2793
- Avci-Adali, M., Ziemer, G., & Wendel, H. P. (2010). Induction of EPC homing on biofunctionalized vascular grafts for rapid in vivo self-endothelialization - A review of current strategies. *Biotechnology Advances*, 28(1), 119-129. doi: 10.1016/j.biotechadv.2009.10.005

- Backer, M. V., Patel, V., Jehning, B. T., Claffey, K. P., & Backer, J. M. (2006). Surface immobilization of active vascular endothelial growth factor via a cysteine-containing tag. *Biomaterials*, 27(31), 5452-5458. doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.06.025
- Baldwin, A. D., & Kiick, K. L. (2010). Polysaccharide-modified synthetic polymeric biomaterials. *Peptide Science*, 94(1), 128-140. doi: 10.1002/bip.21334
- Berk, B. C. (2001). Vascular Smooth Muscle Growth: Autocrine Growth Mechanisms. *Physiological Reviews*, 81(3), 999-1030.
- Boucher, C., St-Laurent, G., Loignon, M., Jolicoeur, M., De Crescenzo, G., & Durocher, Y. (2008). The Bioactivity and Receptor Affinity of Recombinant Tagged EGF Designed for Tissue Engineering Applications Is Defined by the Nature and Position of the Tags. *Tissue Engineering Part A*, 14(12), 2069-2077. doi: 10.1089/ten.tea.2008.0037
- Byzova, T. V., Goldman, C. K., Pampori, N., Thomas, K. A., Bett, A., Shattil, S. J., & Plow, E. F. (2000). A Mechanism for Modulation of Cellular Responses to VEGF: Activation of the Integrins. *Molecular Cell*, 6(4), 851-860. doi: 10.1016/S1097-2765(05)00076-6
- Camarero, J. A. (2008). Recent developments in the site-specific immobilization of proteins onto solid supports. *Peptide Science*, 90(3), 450-458. doi: 10.1002/bip.20803
- Ceylan, H., Tekinay, A. B., & Guler, M. O. (2011). Selective adhesion and growth of vascular endothelial cells on bioactive peptide nanofiber functionalized stainless steel surface. *Biomaterials*, 32(34), 8797-8805. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.08.018
- Chen, T. T., Luque, A., Lee, S., Anderson, S. M., Segura, T., & Iruela-Arispe, M. L. (2010). Anchorage of VEGF to the extracellular matrix conveys differential signaling responses to endothelial cells. *Journal of Cell Biology*, 188(4), 595-609. doi: 10.1083/jcb.200906044
- Cheng, F., Shang, J., & Ratner, D. M. (2010). A Versatile Method for Functionalizing Surfaces with Bioactive Glycans. *Bioconjugate Chemistry*, 22(1), 50-57. doi: 10.1021/bc1003372
- Chollet, C., Chanseau, C., Remy, M., Guignandon, A., Bareille, R., Labrugere, C., . . . Durrieu, M. C. (2009). The effect of RGD density on osteoblast and endothelial cell behavior on RGD-grafted polyethylene terephthalate surfaces. *Biomaterials*, 30(5), 711-720. doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.10.033

- Collier, J. H., & Segura, T. (2011). Evolving the use of peptides as components of biomaterials. *Biomaterials*, 32(18), 4198-4204. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.02.030
- Crombez, M., Chevallier, P., Gaudreault, R. C., Petitclerc, E., Mantovani, D., & Laroche, G. (2005). Improving arterial prosthesis neo-endothelialization: Application of a proactive VEGF construct onto PTFE surfaces. *Biomaterials*, 26(35), 7402-7409. doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.05.051
- Curcio, A., Torella, D., & Indolfi, C. (2011). Mechanisms of Smooth Muscle Cell Proliferation and Endothelial Regeneration After Vascular Injury and Stenting: Approach to Therapy. *Circulation Journal*, 75(6), 1287-1296. doi: 10.1253/circj.CJ-11-0366
- de Mel, A., Cousins, B. G., & Seifalian, A. M. (2012). Surface Modification of Biomaterials: A Quest for Blood Compatibility. *International Journal of Biomaterials*, 2012, 8. doi: 10.1155/2012/707863
- de Mel, A., Jell, G., Stevens, M. M., & Seifalian, A. M. (2008). Biofunctionalization of Biomaterials for Accelerated in Situ Endothelialization: A Review. *Biomacromolecules*, 9(11), 2969-2979. doi: 10.1021/bm800681k
- Delaittre, G., Greiner, A. M., Pauloehrl, T., Bastmeyer, M., & Barner-Kowollik, C. (2012). Chemical approaches to synthetic polymer surface biofunctionalization for targeted cell adhesion using small binding motifs. *Soft Matter*, 8(28), 7323-7347. doi: 10.1039/C2sm07407a
- Dorafshar, A. H., Angle, N., Bryer-Ash, M., Huang, D., Farooq, M. M., Gelabert, H. A., & Freischlag, J. A. (2003). Vascular endothelial growth factor inhibits mitogen-induced vascular smooth muscle cell proliferation. *Journal of Surgical Research*, 114(2), 179-186. doi: 10.1016/S0022-4804(03)00254-3
- Eliceiri, B. P. (2001). Integrin and Growth Factor Receptor Crosstalk. *Circulation Research*, 89(12), 1104-1110. doi: 10.1161/hh2401.101084
- Ferrara, N., Gerber, H. P., & LeCouter, J. (2003). The biology of VEGF and its receptors. *Natural Medicines*, 9(6), 669-676. doi: 10.1038/nm0603-669
- Fittkau, M. H., Zilla, P., Bezuidenhout, D., Lutolf, M. P., Human, P., Hubbell, J. A., & Davies, N. (2005). The selective modulation of endothelial cell mobility on RGD peptide containing surfaces by YIGSR peptides. *Biomaterials*, 26(2), 167-174. doi: 10.1016/j.biomaterials.2004.02.012

- Galas, R. J., & Liu, J. C. (2014). Surface Density of Vascular Endothelial Growth Factor Modulates Endothelial Proliferation and Differentiation. *Journal of Cellular Biochemistry*, 115(1), 111-120. doi: 10.1002/jcb.24638
- Goddard, J. M., & Hotchkiss, J. H. (2007). Polymer surface modification for the attachment of bioactive compounds. *Progress in Polymer Science*, 32(7), 698-725. doi: 10.1016/j.progpolymsci.2007.04.002
- Graf, J., Ogle, R. C., Robey, F. A., Sasaki, M., Martin, G. R., Yamada, Y., & Kleinman, H. K. (1987). A pentapeptide from the laminin B1 chain mediates cell adhesion and binds to 67000 laminin receptor. *Biochemistry*, 26(22), 6896-6900. doi: 10.1021/bi00396a004
- Guex, A. G., Hegemann, D., Giraud, M. N., Tevæarai, H. T., Popa, A. M., Rossi, R. M., & Fortunato, G. (2014). Covalent immobilisation of VEGF on plasma-coated electrospun scaffolds for tissue engineering applications. *Colloids and Surfaces, B: Biointerfaces*, 123(0), 724-733. doi: 10.1016/j.colsurfb.2014.10.016
- Hatakeyama, H., Kikuchi, A., Yamato, M., & Okano, T. (2006). Bio-functionalized thermoresponsive interfaces facilitating cell adhesion and proliferation. *Biomaterials*, 27(29), 5069-5078. doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.05.019
- Holland, N. B., Qiu, Y. X., Ruegsegger, M., & Marchant, R. E. (1998). Biomimetic engineering of non-adhesive glycocalyx-like surfaces using oligosaccharide surfactant polymers. *Nature*, 392(6678), 799-801. doi: 10.1038/33894
- Hu, X., Neoh, K. G., Zhang, J., Kang, E.-T., & Wang, W. (2012). Immobilization strategy for optimizing VEGF's concurrent bioactivity towards endothelial cells and osteoblasts on implant surfaces. *Biomaterials*, 33(32), 8082-8093. doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.07.057
- Hubbell, J. A., Massia, S. P., Desai, N. P., & Drumheller, P. D. (1991). Endothelial cell-selective materials for tissue engineering in the vascular graft via a new receptor. *Bio/Technology*, 9(6), 568-572. doi: 10.1038/nbt0691-568
- Imoukhuede, P. I., & Popel, A. S. (2011). Quantification and cell-to-cell variation of vascular endothelial growth factor receptors. *Experimental Cell Research*, 317(7), 955-965. doi: 10.1016/j.yexcr.2010.12.014

- Ito, Y. (2008). Covalently immobilized biosignal molecule materials for tissue engineering. *Soft Matter*, 4(1), 46-56. doi: 10.1039/b708359a
- Joddar, B., & Ito, Y. (2011). Biological modifications of materials surfaces with proteins for regenerative medicine. *Journal of Materials Chemistry*, 21(36), 13737-13755. doi: 10.1039/C1jm10984g
- Jun, H.-W., & West, J. L. (2005). Modification of polyurethaneurea with PEG and YIGSR peptide to enhance endothelialization without platelet adhesion. *Journal of Biomedical Materials Research, Part B: Applied Biomaterials*, 72B(1), 131-139. doi: 10.1002/jbm.b.30135
- Kanie, K., Kato, R., Zhao, Y., Narita, Y., Okochi, M., & Honda, H. (2011). Amino acid sequence preferences to control cell-specific organization of endothelial cells, smooth muscle cells, and fibroblasts. *Journal of Peptide Science*, 17(6), 479-486. doi: 10.1002/psc.1355
- Kanie, K., Narita, Y., Zhao, Y., Kuwabara, F., Satake, M., Honda, S., . . . Kato, R. (2012). Collagen type IV-specific tripeptides for selective adhesion of endothelial and smooth muscle cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 109(7), 1808-1816. doi: 10.1002/bit.24459
- Khan, M., Yang, J., Shi, C., Lv, J., Feng, Y., & Zhang, W. (2015). Surface tailoring for selective endothelialization and platelet inhibition via a combination of SI-ATRP and click chemistry using Cys-Ala-Gly-peptide. *Acta Biomaterialia*, 20, 69-81. doi: 10.1016/j.actbio.2015.03.032
- Kuwabara, F., Narita, Y., Yamawaki-Ogata, A., Kanie, K., Kato, R., Satake, M., . . . Ueda, Y. (2012). Novel Small-Caliber Vascular Grafts With Trimeric Peptide for Acceleration of Endothelialization. *The Annals of Thoracic Surgery*, 93(1), 156-163. doi: 10.1016/j.athoracsur.2011.07.055
- Le Saux, G., Magenau, A., Gunaratnam, K., Kilian, Kristopher A., Böcking, T., Gooding, J. J., & Gaus, K. (2011). Spacing of Integrin Ligands Influences Signal Transduction in Endothelial Cells. *Biophysical Journal*, 101(4), 764-773. doi: 10.1016/j.bpj.2011.06.064
- Lee, Y. B., Shin, Y. M., Lee, J.-h., Jun, I., Kang, J. K., Park, J.-C., & Shin, H. (2012). Polydopamine-mediated immobilization of multiple bioactive molecules for the development of functional vascular graft materials. *Biomaterials*, 33(33), 8343-8352. doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.08.011

- Leslie-Barbick, J. E., Moon, J. J., & West, J. L. (2009). Covalently-Immobilized Vascular Endothelial Growth Factor Promotes Endothelial Cell Tubulogenesis in Poly(ethylene glycol) Diacrylate Hydrogels. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 20(12), 1763-1779. doi: 10.1163/156856208x386381
- Liberelle, B., Boucher, C., Chen, J., Jolicoeur, M., Durocher, Y., & De Crescenzo, G. (2010). Impact of Epidermal Growth Factor Tethering Strategy on Cellular Response. *Bioconjugate Chemistry*, 21, 2257-2266. doi: 10.1021/bc1002604
- Lin, Q.-K., Hou, Y., Ren, K.-F., & Ji, J. (2012). Selective endothelial cells adhesion to Arg-Glu-Asp-Val peptide functionalized polysaccharide multilayer. *Thin Solid Films*, 520(15), 4971-4978. doi: 10.1016/j.tsf.2012.03.041
- Litowski, J. R., & Hodges, R. S. (2001). Designing heterodimeric two-stranded α -helical coiled-coils: the effect of chain length on protein folding, stability and specificity. *Journal of Peptide Research*, 58(6), 477-492. doi: 10.1034/j.1399-3011.2001.10972.x
- López Jaramillo, F. J., Hernández Mateo, F., & Santoyo González, F. (2012). Vinyl sulfone: a multi-purpose function in proteomics. In H.-C. Leung (Ed.), *Integrative Proteomics: InTech*.
- Luo, R., Tang, L., Wang, J., Zhao, Y., Tu, Q., Weng, Y., . . . Huang, N. (2013). Improved immobilization of biomolecules to quinone-rich polydopamine for efficient surface functionalization. *Colloids and Surfaces, B: Biointerfaces*, 106(0), 66-73. doi: 10.1016/j.colsurfb.2013.01.033
- Makohliso, S. A., & Melchionna, S. (2001). Molecular characterization of a laminin-derived oligopeptide with implications in biomimetic applications. *Biophysical Chemistry*, 89(2–3), 129-144. doi: 10.1016/S0301-4622(00)00223-4
- Martwiset, S., Koh, A. E., & Chen, W. (2006). Nonfouling Characteristics of Dextran-Containing Surfaces. *Langmuir*, 22(19), 8192-8196. doi: 10.1021/la061064b
- Mason, J. M., & Arndt, K. M. (2004). Coiled Coil Domains: Stability, Specificity, and Biological Implications. *ChemBioChem*, 5(2), 170-176. doi: 10.1002/cbic.200300781
- Massia, S. P., & Hubbell, J. A. (1991). An RGD spacing of 440 nm is sufficient for integrin α V β 3-mediated fibroblast spreading and 140 nm for focal contact and stress fiber formation. *Journal of Cell Biology*, 114(5), 1089-1100.

- Matsuda, T., Kuwana, M., Aomizu, T., Yamagishi, M., Ohtake, H., & Watanabe, G. (2013). Surface design for in situ capture of endothelial progenitor cells: VEGF-bound surface architecture and behaviors of cultured mononuclear cells. *Journal of Biomedical Materials Research, Part B: Applied Biomaterials*, 101B(1), 50-60. doi: 10.1002/jbm.b.32812
- McArthur, S. L., McLean, K. M., Kingshott, P., St John, H. A. W., Chatelier, R. C., & Griesser, H. J. (2000). Effect of polysaccharide structure on protein adsorption. *Colloids and Surfaces, B: Biointerfaces*, 17(1), 37-48. doi: 10.1016/S0927-7765(99)00086-7
- Melchiorri, A. J., Hibino, N., & Fisher, J. P. (2013). Strategies and techniques to enhance the in situ endothelialization of small-diameter biodegradable polymeric vascular grafts. *Tissue Engineering. Part B: Reviews*, 19(4), 292-307. doi: 10.1089/ten.TEB.2012.0577
- Mergy, J., Fournier, A., Hachet, E., & Auzély-Velty, R. (2012). Modification of polysaccharides via thiol-ene chemistry: A versatile route to functional biomaterials. *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry*, 50(19), 4019-4028. doi: 10.1002/pola.26201
- Monchaux, E., & Vermette, P. (2007). Bioactive Microarrays Immobilized on Low-Fouling Surfaces to Study Specific Endothelial Cell Adhesion. *Biomacromolecules*, 8(11), 3668-3673. doi: 10.1021/bm7007907
- Monchaux, E., & Vermette, P. (2008). Cell adhesion resistance mechanisms using arrays of dextran-derivative layers. *Journal of Biomedical Materials Research, Part A*, 85A(4), 1052-1063. doi: 10.1002/jbm.a.31580
- Morales-Sanfrutos, J., Lopez-Jaramillo, J., Ortega-Munoz, M., Megia-Fernandez, A., Perez-Balderas, F., Hernandez-Mateo, F., & Santoyo-Gonzalez, F. (2010). Vinyl sulfone: a versatile function for simple bioconjugation and immobilization. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 8(3), 667-675.
- Murschel, F., Liberelle, B., St-Laurent, G., Jolicoeur, M., Durocher, Y., & De Crescenzo, G. (2013). Coiled-coil-mediated grafting of bioactive vascular endothelial growth factor. *Acta Biomaterialia*, 9(6), 6806-6813. doi: 10.1016/j.actbio.2013.02.032
- Noel, S., Hachem, A., Merhi, Y., & De Crescenzo, G. (2015). Development of a polyester coating combining anti-thrombogenic and cell adhesive properties - Influence of sequence and surface density of adhesion peptides. *Biomacromolecules*. doi: 10.1021/acs.biomac.5b00219

- Noel, S., Liberelle, B., Robitaille, L., & De Crescenzo, G. (2011). Quantification of primary amine groups available for subsequent biofunctionalization of polymer surfaces. *Bioconjugate Chemistry*, 22(8), 1690-1699. doi: 10.1021/bc200259c
- Noel, S., Liberelle, B., Yogi, A., Moreno, M. J., Bureau, M. N., Robitaille, L., & De Crescenzo, G. (2013). A non-damaging chemical amination protocol for poly(ethylene terephthalate) - application to the design of functionalized compliant vascular grafts. *Journal Of Materials Chemistry B*, 1(2), 230-238. doi: 10.1039/C2TB00082B
- Österberg, E., Bergström, K., Holmberg, K., Riggs, J. A., Van Alstine, J. M., Schuman, T. P., . . . Harris, J. M. (1993). Comparison of polysaccharide and poly(ethylene glycol) coatings for reduction of protein adsorption on polystyrene surfaces. *Colloids and Surfaces, A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 77(2), 159-169. doi: 10.1016/0927-7757(93)80112-R
- Pardo, A. M. P., Bryhan, M., Krasnow, H., Hardin, N., Riddle, M., LaChance, O., . . . Hoover, D. S. (2005). Corning® CellBIND® Surface: An Improved Surface for Enhanced Cell Attachment. Corning Life Sciences Technical Monograph CLS-AN-0057 Rev1.
- Phelps, E. A., Headen, D. M., Taylor, W. R., Thulé, P. M., & García, A. J. (2013). Vasculogenic bio-synthetic hydrogel for enhancement of pancreatic islet engraftment and function in type 1 diabetes. *Biomaterials*, 34(19), 4602-4611. doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.03.012
- Poh, C. K., Shi, Z., Lim, T. Y., Neoh, K. G., & Wang, W. (2010). The effect of VEGF functionalization of titanium on endothelial cells in vitro. *Biomaterials*, 31(7), 1578-1585. doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.11.042
- Porter, A. M., Klinge, C. M., & Gobin, A. S. (2011). Biomimetic hydrogels with VEGF induce angiogenic processes in both hUVEC and hMEC. *Biomacromolecules*, 12(1), 242-246. doi: 10.1021/bm101220b
- Ren, X., Feng, Y., Guo, J., Wang, H., Li, Q., Yang, J., . . . Li, W. (2015). Surface modification and endothelialization of biomaterials as potential scaffolds for vascular tissue engineering applications. *Chemical Society Reviews*. doi: 10.1039/C4CS00483C
- Rice, J. J., Martino, M. M., De Laporte, L., Tortelli, F., Briquez, P. S., & Hubbell, J. A. (2013). Engineering the Regenerative Microenvironment with Biomaterials. *Advanced Healthcare Materials*, 2(1), 57-71. doi: 10.1002/adhm.201200197

- Savoji, H., Hadjizadeh, A., Maire, M., Ajji, A., Wertheimer, M. R., & Lerouge, S. (2014). Electrospun Nanofiber Scaffolds and Plasma Polymerization: A Promising Combination Towards Complete, Stable Endothelial Lining for Vascular Grafts. *Macromolecular Bioscience*, 14(8), 1084-1095. doi: 10.1002/mabi.201300545
- Shen, Y. H., Shoichet, M. S., & Radisic, M. (2008). Vascular endothelial growth factor immobilized in collagen scaffold promotes penetration and proliferation of endothelial cells. *Acta Biomaterialia*, 4(3), 477-489. doi: 10.1016/j.actbio.2007.12.011
- Shin, Y. M., Lee, Y. B., Kim, S. J., Kang, J. K., Park, J.-C., Jang, W., & Shin, H. (2012). Mussel-Inspired Immobilization of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) for Enhanced Endothelialization of Vascular Grafts. *Biomacromolecules*, 13(7), 2020-2028. doi: 10.1021/bm300194b
- Staton, C. A., Reed, M. W. R., & Brown, N. J. (2009). A critical analysis of current in vitro and in vivo angiogenesis assays. *International Journal of Experimental Pathology*, 90(3), 195-221. doi: 10.1111/j.1365-2613.2008.00633.x
- Taguchi, T., Kishida, A., Akashi, M., & Maruyama, I. (2000). Immobilization of Human Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF165) onto Biomaterials: An Evaluation of the Biological Activity of Immobilized VEGF165. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 15(4), 309-320. doi: 10.1177/088391150001500403
- Taite, L. J., Yang, P., Jun, H.-W., & West, J. L. (2008). Nitric oxide-releasing polyurethane-PEG copolymer containing the YIGSR peptide promotes endothelialization with decreased platelet adhesion. *Journal of Biomedical Materials Research, Part B: Applied Biomaterials*, 84B(1), 108-116. doi: 10.1002/jbm.b.30850
- Thalla, P. K., Fadlallah, H., Liberelle, B., Lequoy, P., De Crescenzo, G., Merhi, Y., & Lerouge, S. (2014). Chondroitin Sulfate Coatings Display Low Platelet but High Endothelial Cell Adhesive Properties Favorable for Vascular Implants. *Biomacromolecules*, 15(7), 2512-2520. doi: 10.1021/bm5003762
- Traub, S., Morgner, J., Martino, M. M., Höning, S., Swartz, M. A., Wickström, S. A., . . . Eming, S. A. (2013). The promotion of endothelial cell attachment and spreading using FNIII10 fused to VEGF-A165. *Biomaterials*, 34(24), 5958-5968. doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.04.050

- White, S. J., Morton, D. W. A., Cheah, B. C., Bronowska, A., Davies, A. G., Stockley, P. G., . . . Johnson, S. (2012). On-Surface Assembly of Coiled-Coil Heterodimers. *Langmuir*, 28(39), 13877-13882. doi: 10.1021/la3025149
- Yang, Z., Yang, Y., Yan, W., Tu, Q., Wang, J., & Huang, N. (2013). Construction of polyfunctional coatings assisted by gallic acid to facilitate co-immobilization of diverse biomolecules. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 5(21), 10495-10501. doi: 10.1021/am403478k
- Yu, M., Du, F., Ise, H., Zhao, W., Zhang, Y., Yu, Y., . . . Akaike, T. (2012). Preparation and characterization of a VEGF-Fc fusion protein matrix for enhancing HUVEC growth. *Biotechnology Letters*, 34(9), 1765-1771. doi: 10.1007/s10529-012-0959-7
- Yu, Y., & Chau, Y. (2012). One-Step “Click” Method for Generating Vinyl Sulfone Groups on Hydroxyl-Containing Water-Soluble Polymers. *Biomacromolecules*, 13(3), 937-942. doi: 10.1021/bm2014476
- Zachary, I., Mathur, A., Yla-Herttuala, S., & Martin, J. (2000). Vascular Protection : A Novel Nonangiogenic Cardiovascular Role for Vascular Endothelial Growth Factor. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 20(6), 1512-1520. doi: 10.1161/01.atv.20.6.1512
- Zhu, B., Eurell, T., Gunawan, R., & Leckband, D. (2001). Chain-length dependence of the protein and cell resistance of oligo(ethylene glycol)-terminated self-assembled monolayers on gold. *Journal of Biomedical Materials Research*, 56(3), 406-416. doi: 10.1002/1097-4636(20010905)56:3<406::aid-jbm1110>3.0.co;2-r
- Zhu, Y., Mao, Z. W., & Gao, C. Y. (2013). Aminolysis-based surface modification of polyesters for biomedical applications. *RSC Advances*, 3(8), 2509-2519. doi: 10.1039/C2ra22358a
- Zisch, A. H., Lutolf, M. P., Ehrbar, M., Raeber, G. P., Rizzi, S. C., Davies, N., . . . Hubbell, J. A. (2003). Cell-demanded release of VEGF from synthetic, biointeractive cell-ingrowth matrices for vascularized tissue growth. *FASEB Journal*. doi: 10.1096/fj.02-1041fje
- Zisch, A. H., Schenk, U., Schense, J. C., Sakiyama-Elbert, S. E., & Hubbell, J. A. (2001). Covalently conjugated VEGF--fibrin matrices for endothelialization. *Journal of Controlled Release*, 72(1-3), 101-113. doi: 10.1016/S0168-3659(01)00266-8

CHAPITRE 7 DISCUSSION GÉNÉRALE

Tout au long de cette thèse, différents revêtements ont été développés dans le but de modifier les propriétés de surface de prothèses vasculaires synthétiques, et ainsi contrôler, ou du moins orienter, la cascade d'événements biologiques une fois la prothèse implantée. Les propriétés structurales de ces prothèses, et en particulier leur comportement mécanique, présentant également de l'importance, la première étape a été de s'assurer que les modifications apportées par le revêtement se limitaient à la surface (*cf.* Chapitre 4). Le défi à relever pour la surface de la prothèse était alors d'imiter les divers rôles assurés par un endothélium sain, interface idéale entre le sang et le biomatériau. Étant donné la complexité de son fonctionnement, toutes les études convergent vers la régénération d'un tissu endothélial au cœur de l'implant, *in vitro* ou *in vivo*, et à plus ou moins long terme (*cf.* partie 2.3). Les contraintes pratiques inhérentes à une prothèse prête-à-l'emploi limitent fortement les stratégies d'endothélialisation *in vitro*, tandis que l'endothélialisation *in situ* impose, du moins temporairement, d'assurer minimalement quelques fonctions-clés de l'endothélium durant sa formation (*cf.* partie 2.3.2).

En se basant sur ce raisonnement, les stratégies de revêtement développées se sont concentrées sur la *sélectivité du recrutement et de la croissance de cellules endothéliales (EC)*, que ceux-ci aient lieu *in vitro* ou *in situ*. Comme souligné dans une revue il y a quelques mois (Ren et al., 2015), en parallèle de la formation d'un néo-endothélium, le revêtement devait assurer deux fonctions-clés de l'endothélium : *l'hémocompatibilité* (en particulier l'anti-thrombogénicité), traitée dans le Chapitre 5, et la *régulation de la prolifération des cellules musculaires lisses (SMC)* (pour ne pas encourager l'hyperplasie), traitée dans le Chapitre 6. Pour ce faire, nous avons opté pour l'utilisation de molécules inertes en arrière-plan de biomolécules judicieusement choisies pour viser sélectivement les EC (et non les plaquettes et SMC).

“The overarching question emerging is whether the optimal material for tissue regeneration is represented by a substrate composed of native biologic molecules, which performs well but has limited tunability, or one that presents biologic motifs or modules (*e.g.* RGD) patterned onto an inert background, which allows greater control but is more difficult to engineer with sufficient biologic information. This is yet another dilemma for which there is no straightforward answer; each type of approach will likely have benefit for certain types of therapeutic applications.” (Bellis, 2011)

Ce dilemme est au cœur des propositions développées pour les prothèses vasculaires, où les prothèses (partiellement) synthétiques (TEVG) forment une alternative aux prothèses entièrement biologiques (TEBV), comme discuté en introduction (*cf.* partie 1.4). A l'échelle des études menées ici, ce dilemme peut se généraliser à un choix entre simplicité et complexité, qui s'est imposé dans plusieurs facettes du projet.

Peptides vs protéines

Les protéines interagissent avec leurs partenaires biologiques par le biais de sites actifs aux séquences parfois restreintes à trois acides aminés seulement. Cette constatation a mené à l'utilisation de ces simples séquences telles que RGD pour reproduire l'interaction entre la matrice extracellulaire (ECM) et les cellules, menant à l'adhésion de ces dernières. Comme mentionné à plusieurs reprises tout au long de cette thèse, les peptides présentent en effet plusieurs avantages par rapport aux protéines, notamment quant aux aspects pratiques de synthèse, greffage, et coûts, et quant à la sélection d'un site actif particulier, et donc d'une fonction particulière de la protéine en question (*cf.* parties 2.3.3.1 et 2.5.2.3). Le paradoxe sous-jacent est que cette fraction de protéine ne fait généralement pas gagner en sélectivité au niveau de l'interaction avec ses partenaires (Collier & Segura, 2011). Les structures secondaires et tertiaires des protéines sont souvent responsables de la sélectivité accrue de l'action des protéines sur leur environnement.

Suite à l'identification dans la littérature de séquences de l'ECM pertinentes, notre choix s'est porté sur la praticité en utilisant ces peptides pour favoriser l'adhésion sélective des EC (vs les plaquettes et les SMC, *cf.* Tableau 2-3). Plusieurs séquences prometteuses ont été testées, à savoir YIGSR, REDV et CAG, en comparaison à la séquence non-sélective RGD. YIGSR n'a démontré aucune sélectivité, et favorisait à la fois l'adhésion des EC, des plaquettes et des SMC. Aucune activité des peptides REDV et CAG n'a été observée vis-à-vis des différents types cellulaires, ce qui suggère soit une insuffisance de la courte séquence, soit une sélectivité parmi les différentes lignées/donneurs de cellules endothéliales. En conclusion, nos résultats vont dans le sens d'une insuffisance des peptides pour assurer un rôle sélectif sur l'adhésion cellulaire.

Petites molécules vs polymères

À deux reprises, un choix a dû être fait entre de petites molécules et de longs polymères. Tout d'abord, lors du choix de l'agent d'amination du PET, le polyvinylamine (PVAm) a été choisi comme alternative aux petites molécules diamminées plus usuelles, telles que l'éthylènediamine. Ces

dernières présentaient l'avantage d'être moins coûteuses et mieux définies, mais étaient trop réactives pour l'application visée. En effet, l'utilisation d'un polymère a permis d'assurer une modification de surface, avec peu de diffusion dans le volume et une faible altération mécanique du matériau modifié.

Par la suite, pour assurer un arrière-plan anti-adhésif (*low-fouling*) à nos revêtements, les oligomères d'éthylène glycol (PEG) ont été considérés dans un premier temps, puis remplacés par le dextrane. Dans ce cas-ci, les petites molécules de PEG, mieux définies que le dextrane, étaient également plus coûteuses. De plus, le dextrane présentait une alternative naturelle au PEG synthétique.

L'utilisation de polymères tels que PVAm et le dextrane, malgré leurs avantages respectifs, pose des questions de conformation à la surface, qui reste complexe à contrôler et à caractériser. Des discussions ont été menées dans le Chapitre 4 et le Chapitre 6 quant à la conformation possiblement favorable des polymères en question, mais elles restaient basées sur des hypothèses.

Caractérisation des revêtements

Une attention particulière a été portée à la caractérisation des revêtements développés, de façon à justifier et valider chaque étape. Au cours de l'analyse des méthodes employées dans la littérature ainsi que des méthodes utilisées, plusieurs points se sont dégagés :

- *L'importance des conditions expérimentales* : Dans le cas de modifications chimiques de surface, de nombreuses méthodes de caractérisation imposent des conditions bien spécifiques telles qu'un substrat aux propriétés optiques particulières (SPR, QCM-D, ellipsométrie) ou une caractérisation sous vide et à sec (XPS, SEM). Ainsi, les conditions expérimentales sont rarement représentatives de la réalité chimique et/ou biologique et leur emploi peut fausser les interprétations. Similairement, dans le cas d'essais cellulaires, il faut différencier un test de bioactivité du revêtement – fait par exemple sans sérum pour obtenir une différence maximale entre les contrôles positif et négatif – d'un test se rapprochant des conditions réelles. De manière plus générale, les résultats *in vitro* ou sur des modèles animaux doivent être humblement analysés sans surestimer leur pouvoir prédictif des essais cliniques (Zilla et al., 2007).
- *L'importance des contrôles* : Bien qu'ils rendent les tests plus lourds et parfois complexes, les contrôles permettent de s'affranchir, du moins en partie, des biais de l'utilisateur et du

laboratoire ainsi que de l'influence de paramètres inconnus ou non considérés. Pour ces mêmes raisons, en plus de l'utilisation des classiques contrôles négatif et positif, il nous est apparu primordial d'effectuer des comparaisons à des éléments ou techniques connus à l'interne. C'est pourquoi nous avons testé l'éthylènediamine (agent d'aminolyse courant) en parallèle du PVAm au Chapitre 4, ainsi que la séquence RGD en parallèle des séquences supposées sélectives au Chapitre 5 et au Chapitre 6. En effet, la variété des stratégies, substrats, techniques et cellules employés limitent très fortement les comparaisons à la littérature (Staton et al., 2009).

Au vu de ces différents points, la caractérisation méticuleuse des revêtements peut rapidement devenir très complexe et la recherche de simplicité nous a paru essentielle. Par exemple, pour la caractérisation des biomolécules, l'utilisation d'une séquence peptidique contrôle (*scrambled*) est un contrôle pertinent et efficace, bien que rarement employé (Tableau 2-3). Dans le Chapitre 5, par souci de simplicité, un seul peptide *scrambled* a été utilisé (REVD) comme contrôle des autres séquences (RGD, YIGSR et REDV). Par la suite, dans le Chapitre 6, les contrôles RGE et SGIYR ont été ajoutés, amenant un autre regard sur la pertinence du peptide YIGSR – supposée au Chapitre 5 – au vu des résultats similaires obtenues avec SGIYR (*cf.* Annexe C).

Pour la caractérisation de densités de groupements, nous avons validé une méthode colorimétrique, basée sur l'interaction entre la molécule d'Orange II et les amines primaires, en la confrontant à une méthode robuste reconnue : l'XPS (Noel et al., 2011). Le test Orange II a ainsi démontré son intérêt et a été utilisé par la suite comme alternative aux méthodes plus lourdes et coûteuses.

Enfin, il est bon de noter que même s'il existe une méthode de quantification disponible pour un élément donné, la gamme couverte par la technique n'est pas toujours pertinente pour la caractérisation (manque de sensibilité ou saturation). Nous nous sommes retrouvés confrontés à cette limite lors de la mesure de la densité de peptides dans le Chapitre 5 et le Chapitre 6, et en particulier pour le peptide K5 (*cf.* Annexe D), avec un manque de sensibilité des techniques spectroscopiques utilisées (relargage du groupement thiopyridone et test Ellman). De même, la quantité de NO produite par les HUVEC n'était pas suffisante pour être détectée par le réactif de Griess.

Limiter les inconnues

Étant données les limites de la caractérisation des revêtements, il est apparu important au travers de nos lectures d'utiliser des *mécanismes réactionnels définis* et spécifiques pour les différentes modifications chimiques apportées au substrat. Il s'agit d'une des raisons premières ayant porté notre choix vers la chimie humide plutôt que vers le plasma pour la méthode d'amination de nos structures dans le Chapitre 4 (cf. partie 2.5.1).

Lors du greffage de peptides, nous avons souhaité *contrôler le site de greffage* en ajoutant une étiquette cystéine, dotant les peptides d'un unique thiol disponible pour leur immobilisation spécifique et orientée (cf. partie 2.5.2.3). Malgré cet avantage majeur, le choix de la cystéine a démontré certaines limites du fait de l'oxydation parasite des peptides en solution (cf. Annexe D). Notamment dans le Chapitre 5, les peptides étaient greffés sur le substrat *via* un pont disulfure avec le PEG, ce qui a rendu délicat le choix de conditions expérimentales limitant la formation d'un lien disulfure entre les peptides tout en assurant le greffage. Les peptides d'adhésion (RGD, YIGSR, REDV) étaient heureusement peu sujets à la dimérisation, contrairement au peptide K5 qui a rapidement imposé un changement de stratégie de greffage (thioether *via* VS, plutôt que disulfure *via* oPSS) du fait de sa rapide oxydation en solution (cf. Annexe D).

Lors du greffage de VEGF au Chapitre 6, nous avons souhaité éviter la chimie carbodiimide, pourtant très fréquemment employée (Tableau 2-4), du fait d'un mauvais contrôle de l'orientation et de la conformation de la protéine ainsi greffée. L'utilisation du système peptidique E5/K5 (cf. partie 2.5.2.2.3) nous a permis une capture orientée, qui a prouvé son efficacité de par la faible densité de protéines nécessaires à induire la prolifération des HUVEC (50 fmol/cm²), comme discuté dans le Chapitre 6.

À la fois pour les peptides et VEGF, *la densité de greffage a été contrôlée*, caractérisée et variée, ce qui est étonnamment rare dans la littérature (Tableau 2-6 et Tableau 2-4). Renforçant la validité de ces études de densité, les stratégies de greffage décrites ci-dessus assurent vraisemblablement l'obtention d'une seule population de biomolécules, en termes de conformation et orientation.

Enfin, associé à ce contrôle nécessaire sur les modifications apportées au matériau, il nous a semblé justifié de *simplifier le plus possible les constructions développées*. Certains éléments comme le PEG ou le dextrane peuvent assurer plusieurs rôles à la fois, à savoir espaceur/lien (cf. partie 2.5.2.4) et agent anti-thrombogène (cf. partie 2.2.4). De même, bien que seule la prolifération ait été testée au Chapitre 6, VEGF peut assurer différents rôles (migration, prolifération, survie) et

peut également servir à recruter les cellules progénitrices endothéliales (*cf.* partie 2.3.3.2). La multifonctionnalité et la recherche de sélectivité ne doivent donc pas nécessairement rimer avec constructions complexes, difficiles à justifier et à reproduire.

“For commercial success tissue engineering products must be not only efficacious but also cost-effective, introducing a potential dichotomy between the need for sophistication and ease of production. (...) Clearly there is a danger, by over-engineering devices, of making their translation to clinical use unlikely.” (Place, Evans, et al., 2009).

CHAPITRE 8 CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

Dans le contexte du remplacement d'artères de petit diamètre, l'objectif général du projet visait à développer un revêtement multifonctionnel de *prothèse synthétique* possédant les caractéristiques suivantes :

- Applicable à une structure polymérique aux propriétés mécaniques définies (e.g. compliance) *sans l'endommager* ;
- Résistant à l'adsorption de protéines et l'adhésion plaquettaire, i.e. *non thrombogène* ;
- Favorable à l'adhésion et la prolifération de cellules endothéliales (EC), i.e. *endothélialisable* ;
- Défavorable à la prolifération des cellules musculaires lisses (SMC), i.e. *ne contribuant pas à l'hyperplasie néointimale*.

Nous allons dans cette partie tirer les conclusions associées aux hypothèses et objectifs spécifiques décrits dans le Chapitre 3.

Tout d'abord, plusieurs outils ont été développés et utilisés dans ce projet, et pourront contribuer au développement de nouvelles technologies dans le domaine du génie tissulaire et des biotechnologies :

- *La méthode de quantification des amines par Orange II*, bien qu'elle ne soit pas nouvelle, a été validée rigoureusement (Noel et al., 2011). Cette technique de caractérisation présente un intérêt pour une quantification simple, rapide et peu coûteuse des groupements amines exposés en surface d'un matériau. Plus précisément, elle permet d'obtenir le nombre de groupements chargés à un pH donné, incluant uniquement les amines primaires dans notre contexte, sur une gamme allant de quelques centaines de pmol/cm² à quelques dizaines de nmol/cm².
- *L'utilisation de longs polymères aminés comme agents d'aminolyse de polyester* présente une alternative intéressante aux agents d'aminolyse communs tels que l'éthylènediamine. Dans notre contexte, et probablement bien d'autres, seule la modification de surface est pertinente pour que le polyester, ici le PET, expose des fonctions amines disponibles pour le greffage subséquent d'autres molécules. Nos résultats sur la dégradation mécanique de

structures de PET modifiées démontrent que l'aminolyse par le polyvinylamine (PVAm) est bien plus douce que celle par l'EtDA. Elle présente de fait un grand intérêt et nous a permis d'atteindre notre 1^{er} objectif tout en validant notre 1^{ère} hypothèse (*cf.* Chapitre 4). De plus, le PVAm est un polymère possédant une très forte densité d'amines primaires, permettant par la suite d'obtenir une proximité entre les biomolécules qui y seront conjuguées, comme souligné dans une revue parue ultérieurement à l'article (Pelton, 2014).

- *L'utilisation d'un espaceur anti-adhésif (low-fouling)*, tel que le PEG-SPDP, a permis d'assurer le lien entre les biomolécules et la surface tout en limitant l'adsorption d'autres composés (protéines, plaquettes, cellules), ce qui valide notre 2^{ème} hypothèse et amorce l'atteinte du 2^{ème} objectif (*cf.* Chapitre 5). De manière plus générale, cette stratégie permet à la fois d'étudier spécifiquement le rôle des biomolécules sélectionnées et d'assurer leur effet sélectif s'il y a lieu.
- *Une modification du dextrane avec des fonctions vinylsulfone (dex-VS)* a été mise en œuvre. Le dex-VS est un polymère neutre, hydrophile, multifonctionnel et polyvalent présentant une alternative intéressante au PEG (fonctionnalisé) et au dextrane carboxyméthylé, aussi bien pour les revêtements de surface que pour la formation d'hydrogels. Bien que la thrombogénicité du dex-VS n'ait pas été testée, les propriétés anti-adhésives du revêtement de dex-VS vis-à-vis des EC et SMC ont été effectivement observées, ce qui valide partiellement notre 4^{ème} hypothèse.

Au-delà de ces outils, les résultats obtenus dans ce projet permettent de tirer certaines leçons ainsi que de contribuer à l'avancement des connaissances dans le domaine des revêtements vasculaires.

- *Les peptides d'adhésion* testés, RGD, YIGSR, CAG et REDV, dont les séquences sont issues de protéines de l'ECM, manquent de sélectivité vis-à-vis des cellules endothéliales. La 3^{ème} hypothèse se trouve ici réfutée (*cf.* Chapitre 5), nous empêchant d'atteindre complètement notre 2^{ème} objectif. D'autre part, nos résultats remettent en question certains résultats observés dans la littérature et traduisent ainsi les limites de l'utilisation de peptides comparés aux protéines (*cf.* Discussion générale).
- *La capture efficace et orientée de VEGF* a permis de favoriser la prolifération des cellules endothéliales sélectivement par rapport aux SMC, ce qui valide notre 5^{ème} hypothèse (*cf.* Chapitre 6). VEGF s'avère ainsi un candidat très intéressant pour les applications

vasculaires. D'autre part, notre stratégie de greffage permet de remettre en perspective les stratégies rapportées dans la littérature, où les quantités nécessaires sont bien plus élevées, probablement du fait d'une mauvaise orientation lors d'un greffage classique par chimie carbodiimide.

- ***La co-immobilisation de RGD et VEGF***, malgré le manque de sélectivité du premier, a permis à la fois d'améliorer l'adhésion et la prolifération des cellules endothéliales (cf. Chapitre 6). Ceci valide notre 7^{ème} hypothèse et permet d'atteindre notre 3^{ème} objectif. Des stratégies multifonctionnelles de ce type présentent donc un fort intérêt pour améliorer l'endothélialisation de prothèses vasculaires.

Le projet de doctorat présenté dans cette thèse présentait toutefois certaines limitations et contraintes en termes de temps et de ressources.

- La principale contrainte est que nos études se déroulent *in vitro et avec des lignées cellulaires primaires modèles* (HUVEC et AoSMC). Bien qu'il serait prématuré à ce stade de l'étude d'en être autrement, il faut rester conscient de cette limite tout en justifiant et caractérisant rigoureusement la démarche et les méthodes.
- ***Les quantités de matériel***, notamment de peptide K5 et de protéines, étaient limitées, pour des raisons évidentes de temps et coûts de production. Ceci a imposé notamment d'utiliser de longs temps de réaction, pour atteindre de meilleurs rendements, ainsi que d'améliorer, quand cela était possible, les cinétiques de réaction. Bien que des considérations de consommation minimale de matériel soient utiles à long terme, elles étaient relativement prématurées à ce stade de la recherche.
- ***Le nombre de conditions*** pouvant être menées en parallèle restait limité à ce qu'il est humainement possible d'entreprendre. Ceci nous a amené à changer de substrat au Chapitre 6 par exemple, l'utilisation de plaques à 96 puits étant favorable à la multiplication des conditions. Des essais cellulaires sous cisaillement auraient pu être menés mais avec une seule chambre de cisaillement, une seule condition (non répétée) à la fois pouvait être testée, ce qui limitait fortement les possibilités d'étude.
- ***Le matériel et l'expertise disponibles*** au laboratoire ont soutenu le projet tout au long de son déroulement, mais l'ont aussi orienté dans certaines directions. Notamment le greffage des peptides via l'étiquette cystéine dont la pertinence peut être questionnée dans le cas du

K5 (cf. Annexe D). D'autre part, le manque d'expertise et de matériel, imposant le développement et/ou la mise en place de nouveaux protocoles, a parfois limité les tests menés (e.g. migration, co-culture, essais tubulaires).

De ces limitations et contraintes, ainsi que des résultats obtenus et leçons tirées, découlent les recommandations suivantes :

▪ *Sur les revêtements de prothèses vasculaires*

- En termes d'hémocompatibilité, la thrombogénicité du dextrane reste encore à tester, avec des tests d'adsorption de protéines et d'adhésion plaquettaire, similaires à ceux menés au Chapitre 5 avec le PEG.
- La recherche de biomolécules permettant l'adhésion sélective des EC/EPC et non des plaquettes et SMC est restée infructueuse dans ce projet et devra être poursuivie. La plateforme des plaques à puits revêtues de dextrane-VS sera ici idéale pour valider la sélectivité de nouvelles biomolécules.
- En se restreignant aux essais *in vitro*, le revêtement pourrait être testé vis-à-vis des EPC plutôt que des HUVEC, dans l'optique d'une endothélialisation s'opérant *in situ*. Le recrutement des EPC circulantes (par VEGF et/ou un peptide d'adhésion) ainsi que la résistance au cisaillement des EPC adhérentes serait intéressants à étudier.
- Pour réaliser ces études sous cisaillement, un système permettant de répéter efficacement les conditions et expériences devra être développé et mis en place. Plutôt que de multiplier le nombre de chambres de cisaillement, il pourrait s'agir de faire de contrôler spatialement le revêtement (*micropatterning*) et d'ainsi tester différentes conditions sur une seule surface.
- Concernant la régulation de la prolifération des SMC, il serait intéressant d'étudier la sécrétion de facteurs clés par les EC/EPC tels que NO, PGI₂, FGF-2 et TGF-β1, possiblement stimulée par VEGF, et d'étudier/valider leur rôle sur les SMC. *In fine*, des expériences en co-culture seraient nécessaires, en exploitant éventuellement l'idée d'un double revêtement : luminal pour les EC, et abluminal pour les SMC (avec par exemple le peptide d'adhésion VAPG dérivé de l'élastine).

▪ *Sur les outils utilisés et/ou développés :*

- La stratégie de greffage du K5 devrait être revue pour ne pas impliquer de groupement rendant possible la dimérisation, comme c'est le cas pour la cystéine. Des alternatives existent telles que l'utilisation d'acide aminés non naturels présentant des groupements spécifiques tels que les azotures (*azide*) ou les alcynes (*alkyne*) (Camarero, 2008).
- La co-immobilisation de divers facteurs de croissance peut être mise en place avec le système développé dans le Chapitre 6 et les protéines disponibles dans le groupe : E5-VEGF, E5-EGF, E5-FGF. Pour d'autres applications que celle décrite dans cette thèse, l'étude des synergies entre les différents facteurs pourraient présenter de l'intérêt.
- Enfin, les différents dex-VS produits pourraient être utilisés pour former des hydrogels, avec des facteurs immobilisés tels que RGD et VEGF (ou d'autres) pour favoriser la vascularisation de tissus formés *in vitro*.

BIBLIOGRAPHIE

- Anderson, E. J., & Knothe Tate, M. L. (2007). Open access to novel dual flow chamber technology for in vitro cell mechanotransduction, toxicity and pharmacokinetic studies. *Biomedical Engineering Online*, 6(1), 46. doi:10.1186/1475-925X-6-46
- Anderson, S. M., Chen, T. T., Iruela-Arispe, M. L., & Segura, T. (2009). The phosphorylation of vascular endothelial growth factor receptor-2 (VEGFR-2) by engineered surfaces with electrostatically or covalently immobilized VEGF. *Biomaterials*, 30(27), 4618-4628. doi:10.1016/j.biomaterials.2009.05.030
- Anderson, S. M., Shergill, B., Barry, Z. T., Manousiouthakis, E., Chen, T. T., Botvinick, E., . . . Segura, T. (2011). VEGF internalization is not required for VEGFR-2 phosphorylation in bioengineered surfaces with covalently linked VEGF. *Integrative Biology*, 3(9), 887-896. doi:10.1039/c1ib00037c
- Andukuri, A., Kushwaha, M., Tambralli, A., Anderson, J. M., Dean, D. R., Berry, J. L., . . . Jun, H.-W. (2011). A hybrid biomimetic nanomatrix composed of electrospun polycaprolactone and bioactive peptide amphiphiles for cardiovascular implants. *Acta Biomaterialia*, 7(1), 225-233. doi:10.1016/j.actbio.2010.08.013
- Asahara, T., Bauters, C., Pastore, C., Kearney, M., Rossow, S., Bunting, S., . . . Isner, J. M. (1995). Local delivery of vascular endothelial growth factor accelerates reendothelialization and attenuates intimal hyperplasia in balloon-injured rat carotid artery. *Circulation*, 91(11), 2793-2801. doi:10.1161/01.CIR.91.11.2793
- Asahara, T., Murohara, T., Sullivan, A., Silver, M., van der Zee, R., Li, T., . . . Isner, J. M. (1997). Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*, 275(5302), 964-967. doi:10.1126/science.275.5302.964
- Avci-Adali, M., Ziemer, G., & Wendel, H. P. (2010). Induction of EPC homing on biofunctionalized vascular grafts for rapid in vivo self-endothelialization - A review of current strategies. *Biotechnology Advances*, 28(1), 119-129. doi:10.1016/j.biotechadv.2009.10.005
- Avny, Y., & Rebenfeld, L. (1986). Chemical modification of polyester fiber surfaces by amination reactions with multifunctional amines. *Journal of Applied Polymer Science*, 32(3), 4009-4025. doi:10.1002/app.1986.070320318
- Bacakova, L., Filova, E., Parizek, M., Ruml, T., & Svorcik, V. (2011). Modulation of cell adhesion, proliferation and differentiation on materials designed for body implants. *Biotechnology Advances*, 29(6), 739-767. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.06.004
- Backer, M. V., Patel, V., Jehning, B. T., Claffey, K. P., & Backer, J. M. (2006). Surface immobilization of active vascular endothelial growth factor via a cysteine-containing tag. *Biomaterials*, 27(31), 5452-5458. doi:10.1016/j.biomaterials.2006.06.025
- Baguneid, M., Murray, D., Salacinski, H. J., Fuller, B., Hamilton, G., Walker, M., & Seifalian, A. M. (2004). Shear-stress preconditioning and tissue-engineering-based paradigms for generating arterial substitutes. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 39(Pt 2), 151-157. doi:10.1042/BA20030148

- Baguneid, M. S., Seifalian, A. M., Salacinski, H. J., Murray, D., Hamilton, G., & Walker, M. G. (2006). Tissue engineering of blood vessels. *British Journal of Surgery*, 93(3), 282-290. doi:10.1002/bjs.5256
- Bai, J., Açıkan, B., Ghahary, A., Ritchie, B., Somayaji, V., & Uludağ, H. (2004). Poly(ethyleneimine)/arginine–glycine–aspartic acid conjugates prepared with N-succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionate: An investigation of peptide coupling and conjugate stability. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 42(23), 6143-6156. doi:10.1002/pola.20472
- Bajpai, V. K., & Andreadis, S. T. (2012). Stem Cell Sources for Vascular Tissue Engineering and Regeneration. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 18(5), 405-425. doi:10.1089/ten.teb.2011.0264
- Bala, K., Ambwani, K., & Gohil, N. K. (2011). Effect of different mitogens and serum concentration on HUVEC morphology and characteristics: Implication on use of higher passage cells. *Tissue and Cell*, 43(4), 216-222. doi:10.1016/j.tice.2011.03.004
- Balcells, M., Martorell, J., Olivé, C., Santacana, M., Chitalia, V., Cardoso, A. A., & Edelman, E. R. (2010). Smooth Muscle Cells Orchestrate the Endothelial Cell Response to Flow and Injury. *Circulation*, 121(20), 2192-2199. doi:10.1161/circulationaha.109.877282
- Baldwin, A. D., & Kiick, K. L. (2010). Polysaccharide-modified synthetic polymeric biomaterials. *Peptide Science*, 94(1), 128-140. doi:10.1002/bip.21334
- Ballermann, B. J., Dardik, A., Eng, E., & Liu, A. (1998). Shear stress and the endothelium. *Kidney International Supplement*, 67(S67), S100-108. doi:10.1046/j.1523-1755.1998.06720.x
- Baron, R., Dashwood, M. R., Arbeus, M., Filbey, D., & Souza, D. S. (2010). Recent Strategies to Improve Graft Performance in Patients Undergoing Coronary Artery Bypass Surgery. Are Best Results Achieved by Improved Surgical Techniques of Graft Preparation? *Advances in Vascular Medicine* (pp. 371-397): Springer.
- Bech, L., Meylheuc, T., Lepoittevin, B., & Roger, P. (2007). Chemical surface modification of poly(ethylene terephthalate) fibers by aminolysis and grafting of carbohydrates. *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry*, 45(11), 2172-2183. doi:10.1002/Pola.21983
- Bellis, S. L. (2011). Advantages of RGD peptides for directing cell association with biomaterials. *Biomaterials*, 32(18), 4205-4210. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.02.029
- Berg, M. C., Yang, S. Y., Hammond, P. T., & Rubner, M. F. (2004). Controlling Mammalian Cell Interactions on Patterned Polyelectrolyte Multilayer Surfaces. *Langmuir*, 20(4), 1362-1368. doi:10.1021/la0355489
- Berk, B. C. (2001). Vascular Smooth Muscle Growth: Autocrine Growth Mechanisms. *Physiological Reviews*, 81(3), 999-1030. Retrieved from <http://physrev.physiology.org/physrev/81/3/999.full.pdf>
- Bide, M., Phaneuf, M., Brown, P., McGonigle, G., & LoGerfo, F. (2006). Modification of polyester for medical uses. In J. V. Edwards, G. Buschle-Diller, & S. C. Goheen (Eds.), *Modified fibers with medical and specialty applications* (pp. 91-124): Springer Netherlands.

- Biltresse, S., Attolini, M., & Marchand-Brynaert, J. (2005). Cell adhesive PET membranes by surface grafting of RGD peptidomimetics. *Biomaterials*, 26(22), 4576-4587. doi:10.1016/j.biomaterials.2004.11.042
- Bompais, H., Chagraoui, J., Canron, X., Crisan, M., Liu, X. H., Anjo, A., . . . Uzan, G. (2004). Human endothelial cells derived from circulating progenitors display specific functional properties compared with mature vessel wall endothelial cells. *Blood*, 103(7), 2577-2584. doi:10.1182/blood-2003-08-2770
- Boucher, C., Liberelle, B., Jolicoeur, M., Durocher, Y., & De Crescenzo, G. (2009). Epidermal growth factor tethered through coiled-coil interactions induces cell surface receptor phosphorylation. *Bioconjugate Chemistry*, 20(8), 1569-1577. doi:10.1021/bc9001147
- Boucher, C., Ruiz, J. C., Thibault, M., Buschmann, M. D., Wertheimer, M. R., Jolicoeur, M., . . . De Crescenzo, G. (2010). Human corneal epithelial cell response to epidermal growth factor tethered via coiled-coil interactions. *Biomaterials*, 31(27), 7021-7031. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.05.072
- Boucher, C., St-Laurent, G., Loignon, M., Jolicoeur, M., De Crescenzo, G., & Durocher, Y. (2008). The Bioactivity and Receptor Affinity of Recombinant Tagged EGF Designed for Tissue Engineering Applications Is Defined by the Nature and Position of the Tags. *Tissue Engineering Part A*, 14(12), 2069-2077. doi:10.1089/ten.tea.2008.0037
- Bui, L. N., Thompson, M., McKeown, N. B., Romaschin, A. D., & Kalman, P. G. (1993). Surface modification of the biomedical polymer poly(ethylene terephthalate). *Analyst*, 118(5), 463-474. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1039/AN9931800463>
- Bureau, M. N., Maire, M., Diaz-Quijada, G., Robitaille, L., Ajji, A., & Merhi, Y. (2009). *Nonwoven PET fiber structures for vascular graft applications*. Paper presented at the 67th Annual Technical Conference of the Society of Plastics Engineers, Brookfield, CT, USA.
- Byzova, T. V., Goldman, C. K., Pampori, N., Thomas, K. A., Bett, A., Shattil, S. J., & Plow, E. F. (2000). A Mechanism for Modulation of Cellular Responses to VEGF: Activation of the Integrins. *Molecular Cell*, 6(4), 851-860. doi:10.1016/S1097-2765(05)00076-6
- Cai, L., Dinh, C. B., & Heilshorn, S. C. (2014). One-pot synthesis of elastin-like polypeptide hydrogels with grafted VEGF-mimetic peptides. *Biomaterials Science*, 2(5), 757-765. doi:10.1039/C3BM60293A
- Camarero, J. A. (2008). Recent developments in the site-specific immobilization of proteins onto solid supports. *Peptide Science*, 90(3), 450-458. doi:10.1002/bip.20803
- Campbell, G. R., & Campbell, J. H. (2007). Development of Tissue Engineered Vascular Grafts. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 8(1), 43-50. doi:10.2174/138920107779941426
- Castro, E. A., Echevarría, G. R., Opazo, A., Robert, P. S., & Santos, J. G. (2006). Kinetics and mechanism of the reactions of polyallylamine with aryl acetates and aryl methyl carbonates. *Journal of Physical Organic Chemistry*, 19(2), 129-135. doi:10.1002/poc.1007
- Causa, F., Battista, E., Della Moglie, R., Guarnieri, D., Iannone, M., & Netti, P. A. (2010). Surface Investigation on Biomimetic Materials to Control Cell Adhesion: The Case of RGD Conjugation on PCL. *Langmuir*, 26(12), 9875-9884. doi:10.1021/la100207q

- Ceylan, H., Tekinay, A. B., & Guler, M. O. (2011). Selective adhesion and growth of vascular endothelial cells on bioactive peptide nanofiber functionalized stainless steel surface. *Biomaterials*, 32(34), 8797-8805. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.08.018
- Chan-Park, M. B., Shen, J. Y., Cao, Y., Xiong, Y., Liu, Y., Rayatpisheh, S., . . . Greisler, H. P. (2009). Biomimetic control of vascular smooth muscle cell morphology and phenotype for functional tissue-engineered small-diameter blood vessels. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 88A(4), 1104-1121. doi:10.1002/jbm.a.32318
- Chan, T. R., Stahl, P. J., & Yu, S. M. (2011). Matrix-Bound VEGF Mimetic Peptides: Design and Endothelial-Cell Activation in Collagen Scaffolds. *Advanced Functional Materials*, 21(22), 4252-4262. doi:10.1002/adfm.201101163
- Charbonneau, C., Ruiz, J.-C., Lequoy, P., Hébert, M.-J., De Crescenzo, G., Wertheimer, M. R., & Lerouge, S. (2012). Chondroitin Sulfate and Epidermal Growth Factor Immobilization after Plasma Polymerization: A Versatile Anti-Apoptotic Coating to Promote Healing Around Stent Grafts. *Macromolecular Bioscience*, 12(6), 812-821. doi:10.1002/mabi.201100447
- Chatzizisis, Y. S., Coskun, A. U., Jonas, M., Edelman, E. R., Feldman, C. L., & Stone, P. H. (2007). Role of Endothelial Shear Stress in the Natural History of Coronary Atherosclerosis and Vascular Remodeling: Molecular, Cellular, and Vascular Behavior. *Journal of the American College of Cardiology*, 49(25), 2379-2393. doi:10.1016/j.jacc.2007.02.059
- Chen, F. M., Wu, L. A., Zhang, M., Zhang, R., & Sun, H. H. (2011). Homing of endogenous stem/progenitor cells for in situ tissue regeneration: Promises, strategies, and translational perspectives. *Biomaterials*, 32(12), 3189-3209. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.12.032
- Chen, S., Li, L., Zhao, C., & Zheng, J. (2010). Surface hydration: Principles and applications toward low-fouling/nonfouling biomaterials. *Polymer*, 51(23), 5283-5293. doi:10.1016/j.polymer.2010.08.022
- Chen, T. T., Luque, A., Lee, S., Anderson, S. M., Segura, T., & Iruela-Arispe, M. L. (2010). Anchorage of VEGF to the extracellular matrix conveys differential signaling responses to endothelial cells. *Journal of Cell Biology*, 188(4), 595-609. doi:10.1083/jcb.200906044
- Chen, W., & McCarthy, T. J. (1998). Chemical surface modification of poly(ethylene terephthalate). *Macromolecules*, 31(11), 3648-3655. doi:10.1021/Ma9710601
- Cheng, F., Shang, J., & Ratner, D. M. (2010). A Versatile Method for Functionalizing Surfaces with Bioactive Glycans. *Bioconjugate Chemistry*, 22(1), 50-57. doi:10.1021/bc1003372
- Chiu, J. J., Chen, L. J., Lee, P. L., Lee, C. I., Lo, L. W., Usami, S., & Chien, S. (2003). Shear stress inhibits adhesion molecule expression in vascular endothelial cells induced by coculture with smooth muscle cells. *Blood*, 101(7), 2667-2674. doi:10.1182/blood-2002-08-2560
- Chiu, L. L. Y., & Radisic, M. (2010). Scaffolds with covalently immobilized VEGF and Angiopoietin-1 for vascularization of engineered tissues. *Biomaterials*, 31(2), 226-241. doi:10.1016/j.biomaterials.2009.09.039
- Chlupáč, J., Filova, E., & Bačáková, L. (2009). Blood vessel replacement: 50 years of development and tissue engineering paradigms in vascular surgery. *Physiological Research*, 58(Suppl 2), S119-S139.

- Chollet, C., Chanseau, C., Brouillaud, B., & Durrieu, M. C. (2007). RGD peptides grafting onto poly(ethylene terephthalate) with well controlled densities. *Biomolecular Engineering*, 24(5), 477-482. doi:10.1016/j.bioeng.2007.07.012
- Chollet, C., Chanseau, C., Remy, M., Guignandon, A., Bareille, R., Labrugere, C., . . . Durrieu, M. C. (2009). The effect of RGD density on osteoblast and endothelial cell behavior on RGD-grafted polyethylene terephthalate surfaces. *Biomaterials*, 30(5), 711-720. doi:10.1016/j.biomaterials.2008.10.033
- Collier, J. H., & Segura, T. (2011). Evolving the use of peptides as components of biomaterials. *Biomaterials*, 32(18), 4198-4204. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.02.030
- Croll, T. I., O'Connor, A. J., Stevens, G. W., & Cooper-White, J. J. (2004). Controllable surface modification of poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) by hydrolysis or aminolysis I: physical, chemical, and theoretical aspects. *Biomacromolecules*, 5(2), 463-473. doi:10.1021/bm0343040
- Crombez, M., Chevallier, P., Gaudreault, R. C., Petitclerc, E., Mantovani, D., & Laroche, G. (2005). Improving arterial prosthesis neo-endothelialization: Application of a proactive VEGF construct onto PTFE surfaces. *Biomaterials*, 26(35), 7402-7409. doi:10.1016/j.biomaterials.2005.05.051
- Cross, M. J., Dixelius, J., Matsumoto, T., & Claesson-Welsh, L. (2003). VEGF-receptor signal transduction. *Trends in Biochemical Sciences*, 28(9), 488-494. doi:10.1016/S0968-0004(03)00193-2
- Curcio, A., Torella, D., & Indolfi, C. (2011). Mechanisms of Smooth Muscle Cell Proliferation and Endothelial Regeneration After Vascular Injury and Stenting: Approach to Therapy. *Circulation Journal*, 75(6), 1287-1296. doi:10.1253/circj.CJ-11-0366
- D'Andrea, L. D., Iaccarino, G., Fattorusso, R., Sorriento, D., Carannante, C., Capasso, D., . . . Pedone, C. (2005). Targeting angiogenesis: Structural characterization and biological properties of a de novo engineered VEGF mimicking peptide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(40), 14215-14220. doi:10.1073/pnas.0505047102
- de Belder, A. N. (2000). Dextran *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- De Crescenzo, G., Litowski, J. R., Hodges, R. S., & O'Connor-McCourt, M. D. (2003). Real-time monitoring of the interactions of two-stranded de novo designed coiled-coils: effect of chain length on the kinetic and thermodynamic constants of binding. *Biochemistry*, 42(6), 1754-1763. doi:10.1021/bi0268450
- de Mel, A., Cousins, B. G., & Seifalian, A. M. (2012). Surface Modification of Biomaterials: A Quest for Blood Compatibility. *International Journal of Biomaterials*, 2012, 8. doi:10.1155/2012/707863
- de Mel, A., Jell, G., Stevens, M. M., & Seifalian, A. M. (2008). Biofunctionalization of Biomaterials for Accelerated in Situ Endothelialization: A Review. *Biomacromolecules*, 9(11), 2969-2979. doi:10.1021/bm800681k

- Delaittre, G., Greiner, A. M., Pauloehrl, T., Bastmeyer, M., & Barner-Kowollik, C. (2012). Chemical approaches to synthetic polymer surface biofunctionalization for targeted cell adhesion using small binding motifs. *Soft Matter*, 8(28), 7323-7347. doi:10.1039/C2sm07407a
- Demolliens, A., Boucher, C., Durocher, Y., Jolicoeur, M., Buschmann, M. D., & De Crescenzo, G. (2008). Tyrosinase-catalyzed synthesis of a universal coil-chitosan bioconjugate for protein immobilization. *Bioconjugate Chemistry*, 19(9), 1849-1854. doi:10.1021/Bc800066b
- Desai, M., Seifalian, A. M., & Hamilton, G. (2011). Role of prosthetic conduits in coronary artery bypass grafting. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, 40(2), 394-398. doi:10.1016/j.ejcts.2010.11.050
- Desmet, T., Morent, R., De Geyter, N., Leys, C., Schacht, E., & Dubruel, P. (2009). Nonthermal plasma technology as a versatile strategy for polymeric biomaterials surface modification: A review. *Biomacromolecules*, 10(9), 2351-2378. doi:10.1021/bm900186s
- Deutsch, M., Meinhart, J., Zilla, P., Howanietz, N., Gorlitzer, M., Froeschl, A., . . . Grabenwoeger, M. (2009). Long-term experience in autologous in vitro endothelialization of infrainguinal ePTFE grafts. *Journal of Vascular Surgery*, 49(2), 352-362. doi:10.1016/j.jvs.2008.08.101
- Devine, C., & McCollum, C. (2004). Heparin-bonded Dacron or polytetrafluorethylene for femoropopliteal bypass: five-year results of a prospective randomized multicenter clinical trial. *Journal of Vascular Surgery*, 40(5), 924-931. doi:10.1016/j.jvs.2004.08.033
- Dimitrievska, S., Maire, M., Diaz-Quijada, G. A., Robitaille, L., Ajji, A., Yahia, L., . . . Bureau, M. N. (2011). Low thrombogenicity coating of nonwoven PET fiber structures for vascular grafts. *Macromolecular Bioscience*, 11(4), 493-502. doi:10.1002/mabi.201000390
- Dorafshar, A. H., Angle, N., Bryer-Ash, M., Huang, D., Farooq, M. M., Gelabert, H. A., & Freischlag, J. A. (2003). Vascular endothelial growth factor inhibits mitogen-induced vascular smooth muscle cell proliferation. *Journal of Surgical Research*, 114(2), 179-186. doi:10.1016/S0022-4804(03)00254-3
- Dudash, L. A., Kligman, F. L., Bastijanic, J. M., Kottke-Marchant, K., & Marchant, R. E. (2014). Cross-reactivity of cell-selective CRRETAWAC peptide with human and porcine endothelial cells. *Journal of Biomedical Materials Research, Part A*, 102(8), 2857-2863. doi:10.1002/jbm.a.34960
- Eliceiri, B. P. (2001). Integrin and Growth Factor Receptor Crosstalk. *Circulation Research*, 89(12), 1104-1110. doi:10.1161/hh2401.101084
- Ellison, C. J., Phatak, A., Giles, D. W., Macosko, C. W., & Bates, F. S. (2007). Melt blown nanofibers: Fiber diameter distributions and onset of fiber breakup. *Polymer*, 48(11), 3306-3316. doi:10.1016/j.polymer.2007.04.005
- Ellison, M. S., Fisher, L. D., Alger, K. W., & Zeronian, S. H. (1982). Physical properties of polyester fibers degraded by aminolysis and by alkaline hydrolysis. *Journal of Applied Polymer Science*, 27(1), 247-257. doi:10.1002/app.1982.070270126
- Ercolani, E., Del Gaudio, C., & Bianco, A. (2013). Vascular tissue engineering of small-diameter blood vessels: reviewing the electrospinning approach. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. doi:10.1002/term.1697

- Ferrara, N. (2010). Binding to the Extracellular Matrix and Proteolytic Processing: Two Key Mechanisms Regulating Vascular Endothelial Growth Factor Action. *Molecular Biology of the Cell*, 21(5), 687-690. doi:10.1091/mbc.E09-07-0590
- Ferrara, N., Gerber, H. P., & LeCouter, J. (2003). The biology of VEGF and its receptors. *Natural Medicines*, 9(6), 669-676. doi:10.1038/nm0603-669
- Fillinger, M. F., Sampson, L. N., Cronenwett, J. L., Powell, R. J., & Wagner, R. J. (1997). Coculture of Endothelial Cells and Smooth Muscle Cells in Bilayer and Conditioned Media Models. *Journal of Surgical Research*, 67(2), 169-178. doi:10.1006/jsre.1996.4978
- Fittkau, M. H., Zilla, P., Bezuidenhout, D., Lutolf, M. P., Human, P., Hubbell, J. A., & Davies, N. (2005). The selective modulation of endothelial cell mobility on RGD peptide containing surfaces by YIGSR peptides. *Biomaterials*, 26(2), 167-174. doi:10.1016/j.biomaterials.2004.02.012
- Fukatsu, K. (1992). Mechanical properties of poly(ethylene terephthalate) fibers imparted hydrophilicity with aminolysis. *Journal of Applied Polymer Science*, 45(11), 2037-2042. doi:10.1002/app.1992.070451118
- Galas, R. J., & Liu, J. C. (2014). Surface Density of Vascular Endothelial Growth Factor Modulates Endothelial Proliferation and Differentiation. *Journal of Cellular Biochemistry*, 115(1), 111-120. doi:10.1002/jcb.24638
- Gappa-Fahlenkamp, H., Duan, X., & Lewis, R. S. (2004). Analysis of immobilized L-cysteine on polymers. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 71A(3), 519-527. doi:10.1002/jbm.a.30180
- Goddard, J. M., & Hotchkiss, J. H. (2007). Polymer surface modification for the attachment of bioactive compounds. *Progress in Polymer Science*, 32(7), 698-725. doi:10.1016/j.progpolymsci.2007.04.002
- Gombotz, W. R., Guanghai, W., Horbett, T. A., & Hoffman, A. S. (1991). Protein adsorption to poly(ethylene oxide) surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research*, 25(12), 1547-1562. doi:10.1002/jbm.820251211
- Graf, J., Ogle, R. C., Robey, F. A., Sasaki, M., Martin, G. R., Yamada, Y., & Kleinman, H. K. (1987). A pentapeptide from the laminin B1 chain mediates cell adhesion and binds to 67000 laminin receptor. *Biochemistry*, 26(22), 6896-6900. doi:10.1021/bi00396a004
- Guex, A. G., Hegemann, D., Giraud, M. N., Tevaearai, H. T., Popa, A. M., Rossi, R. M., & Fortunato, G. (2014). Covalent immobilisation of VEGF on plasma-coated electrospun scaffolds for tissue engineering applications. *Colloids and Surfaces, B: Biointerfaces*, 123(0), 724-733. doi:10.1016/j.colsurfb.2014.10.016
- Gupta, B., Plummer, C., Bisson, I., Frey, P., & Hilborn, J. (2002). Plasma-induced graft polymerization of acrylic acid onto poly(ethylene terephthalate) films: characterization and human smooth muscle cell growth on grafted films. *Biomaterials*, 23(3), 863-871. doi:10.1016/s0142-9612(01)00195-8
- Han, F., Jia, X., Dai, D., Yang, X., Zhao, J., Zhao, Y., . . . Yuan, X. (2013). Performance of a multilayered small-diameter vascular scaffold dual-loaded with VEGF and PDGF. *Biomaterials*, 34(30), 7302-7313. doi:10.1016/j.biomaterials.2013.06.006

- Hasan, A., Memic, A., Annabi, N., Hossain, M., Paul, A., Dokmeci, M. R., . . . Khademhosseini, A. (2014). Electrospun scaffolds for tissue engineering of vascular grafts. *Acta Biomaterialia*, 10(1), 11-25. doi:10.1016/j.actbio.2013.08.022
- Hatakeyama, H., Kikuchi, A., Yamato, M., & Okano, T. (2006). Bio-functionalized thermoresponsive interfaces facilitating cell adhesion and proliferation. *Biomaterials*, 27(29), 5069-5078. doi:10.1016/j.biomaterials.2006.05.019
- Heinze, T., Liebert, T., Heublein, B., & Hornig, S. (2006). Functional Polymers Based on Dextran. In D. Klemm (Ed.), *Polysaccharides II* (Vol. 205, pp. 199-291): Springer Berlin Heidelberg.
- Herbert, S. P., & Stainier, D. Y. (2011). Molecular control of endothelial cell behaviour during blood vessel morphogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12(9), 551-564. doi:10.1038/nrm3176
- Hergenreider, E., Heydt, S., Treguer, K., Boettger, T., Horrevoets, A. J. G., Zeiher, A. M., . . . Dimmeler, S. (2012). Atheroprotective communication between endothelial cells and smooth muscle cells through miRNAs. *Nature Cell Biology*, 14(3), 249-256. doi:10.1038/Ncb2441
- Hermanson, G. T. (2013). Chapter 6 - Heterobifunctional Crosslinkers. In G. T. Hermanson (Ed.), *Bioconjugate Techniques (Third edition)* (pp. 299-339). Boston: Academic Press.
- Herring, M. B., Dilley, R., Jersild, R. A., Jr., Boxer, L., Gardner, A., & Glover, J. (1979). Seeding arterial prostheses with vascular endothelium. The nature of the lining. *Annals of Surgery*, 190(1), 84-90. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/464684>
- Hersel, U., Dahmen, C., & Kessler, H. (2003). RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond. *Biomaterials*, 24(24), 4385-4415. doi:10.1016/S0142-9612(03)00343-0
- Hibino, N., McGillicuddy, E., Matsumura, G., Ichihara, Y., Naito, Y., Breuer, C., & Shinoka, T. (2010). Late-term results of tissue-engineered vascular grafts in humans. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 139(2), 431-436, 436.e431-432. doi:10.1016/j.jtcvs.2009.09.057
- Holland, N. B., Qiu, Y. X., Ruegsegger, M., & Marchant, R. E. (1998). Biomimetic engineering of non-adhesive glycocalyx-like surfaces using oligosaccharide surfactant polymers. *Nature*, 392(6678), 799-801. doi:10.1038/33894
- Hoshi, R. A., Van Lith, R., Jen, M. C., Allen, J. B., Lapidos, K. A., & Ameer, G. (2013). The blood and vascular cell compatibility of heparin-modified ePTFE vascular grafts. *Biomaterials*, 34(1), 30-41. doi:10.1016/j.biomaterials.2012.09.046
- Hu, J., Yin, C., Mao, H. Q., Tamada, K., & Knoll, W. (2003). Functionalization of poly(ethylene terephthalate) film by pulsed plasma deposition of maleic anhydride. *Advanced Functional Materials*, 13(9), 692-697. doi:10.1002/adfm.200304384
- Hu, X., Neoh, K. G., Zhang, J., Kang, E.-T., & Wang, W. (2012). Immobilization strategy for optimizing VEGF's concurrent bioactivity towards endothelial cells and osteoblasts on implant surfaces. *Biomaterials*, 33(32), 8082-8093. doi:10.1016/j.biomaterials.2012.07.057

- Huang, J., Gräter, S. V., Corbellini, F., Rinck, S., Bock, E., Kemkemer, R., . . . Spatz, J. P. (2009). Impact of Order and Disorder in RGD Nanopatterns on Cell Adhesion. *Nano Letters*, 9(3), 1111-1116. doi:10.1021/nl803548b
- Hubbell, J. A., Massia, S. P., Desai, N. P., & Drumheller, P. D. (1991). Endothelial cell-selective materials for tissue engineering in the vascular graft via a new receptor. *Bio/Technology*, 9(6), 568-572. doi:10.1038/nbt0691-568
- Hubbell, J. A., Massia, S. P., & Drumheller, P. D. (1992). Surface-grafted Cell-binding Peptides in Tissue Engineering of the Vascular Grafta. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 665(1), 253-258. doi:10.1111/j.1749-6632.1992.tb42589.x
- Humphries, J. D., Byron, A., & Humphries, M. J. (2006). Integrin ligands at a glance. *Journal of Cell Science*, 119(19), 3901-3903. doi:10.1242/jcs.03098
- Hung, H.-S., Wu, C.-C., Chien, S., & Hsu, S.-h. (2009). The behavior of endothelial cells on polyurethane nanocomposites and the associated signaling pathways. *Biomaterials*, 30(8), 1502-1511. doi:10.1016/j.biomaterials.2008.12.003
- Hutchings, H., Ortega, N., & Plouët, J. (2003). Extracellular matrix-bound vascular endothelial growth factor promotes endothelial cell adhesion, migration, and survival through integrin ligation. *The FASEB Journal*. doi:10.1096/fj.02-0691fje
- Hynes, R. O. (2007). Cell–matrix adhesion in vascular development. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 5, 32-40. doi:10.1111/j.1538-7836.2007.02569.x
- Ichinose, J., Morimatsu, M., Yanagida, T., & Sako, Y. (2006). Covalent immobilization of epidermal growth factor molecules for single-molecule imaging analysis of intracellular signaling. *Biomaterials*, 27(18), 3343-3350. doi:10.1016/j.bomaterials.2006.01.047
- Imoukhuede, P. I., & Popel, A. S. (2011). Quantification and cell-to-cell variation of vascular endothelial growth factor receptors. *Experimental Cell Research*, 317(7), 955-965. doi:10.1016/j.yexcr.2010.12.014
- Inoue, S., Imamura, M., Hirano, Y., & Tabata, Y. (2009). Adhesion and Proliferation of Human Adipo-Stromal Cells for Two- or Three-Dimensional Poly(ethylene terephthalate) Substrates with or without RGD Immobilization. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 20, 721-736. doi:10.1163/156856209x426600
- Irena, G., Jolanta, B., & Karolina, Z. (2009). Chemical modification of poly(ethylene terephthalate) and immobilization of the selected enzymes on the modified film. *Applied Surface Science*, 255(19), 8293-8298. doi:10.1016/j.apsusc.2009.05.126
- Ito, Y. (2008). Covalently immobilized biosignal molecule materials for tissue engineering. *Soft Matter*, 4(1), 46-56. doi:10.1039/b708359a
- Ito, Y., Hasuda, H., Terai, H., & Kitajima, T. (2005). Culture of human umbilical vein endothelial cells on immobilized vascular endothelial growth factor. *Journal of Biomedical Materials Research, Part A*, 74A(4), 659-665. doi:10.1002/jbm.a.30360
- Jacot, J., & Wong, J. (2008). Endothelial Injury Induces Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation in Highly Localized Regions of a Direct Contact Co-culture System. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 52(1), 37-46. doi:10.1007/s12013-008-9023-6

- Ji, Y., Wei, Y., Liu, X., Wang, J., Ren, K., & Ji, J. (2012). Zwitterionic polycarboxybetaine coating functionalized with REDV peptide to improve selectivity for endothelial cells. *Journal of Biomedical Materials Research, Part A*, 100A(6), 1387-1397. doi:10.1002/jbm.a.34077
- Jiao, Y.-P., & Cui, F.-Z. (2007). Surface modification of polyester biomaterials for tissue engineering. *Biomedical Materials*, 2(4), R24-R37. doi:10.1088/1748-6041/2/4/r02
- Joddar, B., & Ito, Y. (2011). Biological modifications of materials surfaces with proteins for regenerative medicine. *Journal of Materials Chemistry*, 21(36), 13737-13755. doi:10.1039/C1jm10984g
- Jordan, S. W., & Chaikof, E. L. (2007). Novel thromboresistant materials. *Journal of Vascular Surgery*, 45(6, Supplement), A104-A115. doi:10.1016/j.jvs.2007.02.048
- Jouan, M. R., Bureau, M. N., Ajji, A., Huneault, M. A., & Mantovani, D. (2005). How to design a structure able to mimic the arterial wall mechanical behavior? *Journal of Materials Science*, 40(9-10), 2675-2677. doi:10.1007/s10853-005-2103-8
- Jun, H.-W., & West, J. L. (2005). Modification of polyurethaneurea with PEG and YIGSR peptide to enhance endothelialization without platelet adhesion. *Journal of Biomedical Materials Research, Part B: Applied Biomaterials*, 72B(1), 131-139. doi:10.1002/jbm.b.30135
- Jung, J. P., Moyano, J. V., & Collier, J. H. (2011). Multifactorial optimization of endothelial cell growth using modular synthetic extracellular matrices. *Integrative Biology*, 3(3), 185-196. doi:10.1039/c0ib00112k
- Kanie, K., Kato, R., Zhao, Y., Narita, Y., Okochi, M., & Honda, H. (2011). Amino acid sequence preferences to control cell-specific organization of endothelial cells, smooth muscle cells, and fibroblasts. *Journal of Peptide Science*, 17(6), 479-486. doi:10.1002/psc.1355
- Kanie, K., Narita, Y., Zhao, Y., Kuwabara, F., Satake, M., Honda, S., . . . Kato, R. (2012). Collagen type IV-specific tripeptides for selective adhesion of endothelial and smooth muscle cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 109(7), 1808-1816. doi:10.1002/bit.24459
- Kannan, R. Y., Salacinski, H. J., Butler, P. E., Hamilton, G., & Seifalian, A. M. (2005). Current status of prosthetic bypass grafts: A review. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 74B(1), 570-581. doi:10.1002/jbm.b.30247
- Kantlehner, M., Finsinger, D., Meyer, J., Schaffner, P., Jonczyk, A., Diefenbach, B., . . . Kessler, H. (1999). Selective RGD-mediated adhesion of osteoblasts at surfaces of implants. *Angewandte Chemie-International Edition*, 38(4), 560-562. doi:10.1002/(Sici)1521-3773(19990215)38:4<560::Aid-Anie560>3.0.Co;2-F
- Kapadia, M. R., Popowich, D. A., & Kibbe, M. R. (2008). Modified Prosthetic Vascular Conduits. *Circulation*, 117(14), 1873-1882. doi:10.1161/circulationaha.107.714170
- Katchalsky, A., Mazur, J., & Spitnik, P. (1957). SECTION II: Polybase properties of polyvinylamine. *Journal of Polymer Science*, 23(104), 513-532. doi:10.1002/pol.1957.1202310401
- Kawahara, D., & Matsuda, T. (2012). Hydrodynamic shear-stress-dependent retention of endothelial and endothelial progenitor cells adhered to vascular endothelial growth factor-fixed surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 100B(5), 1218-1228. doi:10.1002/jbm.b.32686

- Keuren, J. F. W., Wielders, S. J. H., Willems, G. M., Morra, M., Cahalan, L., Cahalan, P., & Lindhout, T. (2003). Thrombogenicity of polysaccharide-coated surfaces. *Biomaterials*, 24(11), 1917-1924. doi:10.1016/S0142-9612(02)00620-8
- Khan, M., Yang, J., Shi, C., Lv, J., Feng, Y., & Zhang, W. (2015). Surface tailoring for selective endothelialization and platelet inhibition via a combination of SI-ATRP and click chemistry using Cys-Ala-Gly-peptide. *Acta Biomaterialia*, 20, 69-81. doi:10.1016/j.actbio.2015.03.032
- Kingshott, P., Thissen, H., & Griesser, H. J. (2002). Effects of cloud-point grafting, chain length, and density of PEG layers on competitive adsorption of ocular proteins. *Biomaterials*, 23(9), 2043-2056. doi:10.1016/S0142-9612(01)00334-9
- Koch, S., Yao, C., Grieb, G., Prével, P., Noah, E. M., & Steffens, G. C. M. (2006). Enhancing angiogenesis in collagen matrices by covalent incorporation of VEGF. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 17(8), 735-741. doi:10.1007/s10856-006-9684-x
- Koepsel, J. T., Nguyen, E. H., & Murphy, W. L. (2012). Differential effects of a soluble or immobilized VEGFR-binding peptide. *Integrative Biology*, 4(8), 914-924. doi:10.1039/C2IB20055D
- Konig, G., McAllister, T. N., Dusserre, N., Garrido, S. A., Iyican, C., Marini, A., . . . L'Heureux, N. (2009). Mechanical properties of completely autologous human tissue engineered blood vessels compared to human saphenous vein and mammary artery. *Biomaterials*, 30(8), 1542-1550. doi:10.1016/j.biomaterials.2008.11.011
- Kuwabara, F., Narita, Y., Yamawaki-Ogata, A., Kanie, K., Kato, R., Satake, M., . . . Ueda, Y. (2012). Novel Small-Caliber Vascular Grafts With Trimeric Peptide for Acceleration of Endothelialization. *The Annals of Thoracic Surgery*, 93(1), 156-163. doi:10.1016/j.athoracsur.2011.07.055
- L'Heureux, N., Dusserre, N., König, G., Victor, B., Keire, P., Wight, T. N., . . . McAllister, T. N. (2006). Human tissue-engineered blood vessels for adult arterial revascularization. *Nature Medicine*, 12(3), 361-365. doi:10.1038/nm1364
- Lagunas, A., Comelles, J., Martínez, E., Prats-Alfonso, E., Acosta, G. A., Albericio, F., & Samitier, J. (2012). Cell adhesion and focal contact formation on linear RGD molecular gradients: study of non-linear concentration dependence effects. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 8(4), 432-439. doi:10.1016/j.nano.2011.08.001
- Larsen, C. C., Kligman, F., Tang, C., Kottke-Marchant, K., & Marchant, R. E. (2007). A biomimetic peptide fluorosurfactant polymer for endothelialization of ePTFE with limited platelet adhesion. *Biomaterials*, 28(24), 3537-3548. doi:10.1016/j.biomaterials.2007.04.026
- Le Saux, G., Magenau, A., Gunaratnam, K., Kilian, Kristopher A., Böcking, T., Gooding, J. J., & Gaus, K. (2011). Spacing of Integrin Ligands Influences Signal Transduction in Endothelial Cells. *Biophysical Journal*, 101(4), 764-773. doi:10.1016/j.bpj.2011.06.064
- Lee, J. W., Park, Y. J., Lee, S. J., Lee, S. K., & Lee, K. Y. (2010). The effect of spacer arm length of an adhesion ligand coupled to an alginate gel on the control of fibroblast phenotype. *Biomaterials*, 31(21), 5545-5551. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.03.063

- Lee, Y. B., Shin, Y. M., Lee, J.-h., Jun, I., Kang, J. K., Park, J.-C., & Shin, H. (2012). Polydopamine-mediated immobilization of multiple bioactive molecules for the development of functional vascular graft materials. *Biomaterials*, 33(33), 8343-8352. doi:10.1016/j.biomaterials.2012.08.011
- Lei, Y., Rémy, M., Labrugère, C., & Durrieu, M.-C. (2012). Peptide immobilization on polyethylene terephthalate surfaces to study specific endothelial cell adhesion, spreading and migration. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 23(11), 2761-2772. doi:10.1007/s10856-012-4736-x
- Lequoy, P., Liberelle, B., De Crescenzo, G., & Lerouge, S. (2014). Additive Benefits of Chondroitin Sulfate and Oriented Tethered Epidermal Growth Factor for Vascular Smooth Muscle Cell Survival. *Macromolecular Bioscience*, 14(5), 720-730. doi:10.1002/mabi.201300443
- Leslie-Barbick, J. E., Moon, J. J., & West, J. L. (2009). Covalently-Immobilized Vascular Endothelial Growth Factor Promotes Endothelial Cell Tubulogenesis in Poly(ethylene glycol) Diacrylate Hydrogels. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 20(12), 1763-1779. doi:10.1163/156856208x386381
- Leslie-Barbick, J. E., Saik, J. E., Gould, D. J., Dickinson, M. E., & West, J. L. (2011). The promotion of microvasculature formation in poly(ethylene glycol) diacrylate hydrogels by an immobilized VEGF-mimetic peptide. *Biomaterials*, 32(25), 5782-5789. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.04.060
- Li, D., Zhang, C., Song, F., Lubenec, I., Tian, Y., & Song, Q. H. (2009). VEGF regulates FGF-2 and TGF- β 1 expression in injury endothelial cells and mediates smooth muscle cells proliferation and migration. *Microvascular Research*, 77(2), 134-142. doi:10.1016/j.mvr.2008.09.007
- Li, S., & Henry, J. J. D. (2011). Nonthrombogenic Approaches to Cardiovascular Bioengineering. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 13(1), 451-475. doi:10.1146/annurev-bioeng-071910-124733
- Li, Y.-S. J., Haga, J. H., & Chien, S. (2005). Molecular basis of the effects of shear stress on vascular endothelial cells. *Journal of Biomechanics*, 38(10), 1949-1971. doi:10.1016/j.jbiomech.2004.09.030
- Liang, Y., & Kiick, K. L. (2014). Heparin-functionalized polymeric biomaterials in tissue engineering and drug delivery applications. *Acta Biomaterialia*, 10(4), 1588-1600. doi:10.1016/j.actbio.2013.07.031
- Liberelle, B., Boucher, C., Chen, J., Jolicœur, M., Durocher, Y., & De Crescenzo, G. (2010). Impact of Epidermal Growth Factor Tethering Strategy on Cellular Response. *Bioconjugate Chemistry*, 21, 2257-2266. doi:10.1021/bc1002604
- Lin, Q.-K., Hou, Y., Ren, K.-F., & Ji, J. (2012). Selective endothelial cells adhesion to Arg-Glu-Asp-Val peptide functionalized polysaccharide multilayer. *Thin Solid Films*, 520(15), 4971-4978. doi:10.1016/j.tsf.2012.03.041
- Litowski, J. R., & Hodges, R. S. (2001). Designing heterodimeric two-stranded α -helical coiled-coils: the effect of chain length on protein folding, stability and specificity. *Journal of Peptide Research*, 58(6), 477-492. doi:10.1034/j.1399-3011.2001.10972.x

- Litowski, J. R., & Hodges, R. S. (2002). Designing Heterodimeric Two-stranded α -Helical Coiled-coils. *Journal of Biological Chemistry*, 277(40), 37272-37279. doi:10.1074/jbc.M204257200
- Liu, H., Kennard, S., & Lilly, B. (2009). NOTCH3 Expression Is Induced in Mural Cells Through an Autoregulatory Loop That Requires Endothelial-Expressed JAGGED1. *Circulation Research*, 104(4), 466-475. doi:10.1161/circresaha.108.184846
- Liu, J. C., Heilshorn, S. C., & Tirrell, D. A. (2004). Comparative Cell Response to Artificial Extracellular Matrix Proteins Containing the RGD and CS5 Cell-Binding Domains. *Biomacromolecules*, 5(2), 497-504. doi:10.1021/bm034340z
- Liu, L., Ratner, B. D., Sage, E. H., & Jiang, S. (2007). Endothelial Cell Migration on Surface-Density Gradients of Fibronectin, VEGF, or Both Proteins. *Langmuir*, 23(22), 11168-11173. doi:10.1021/la701435x
- Liu, Y., Zhang, J., Wang, J., Wang, Y., Zeng, Z., Liu, T., . . . Huang, N. (2014). Tailoring of the dopamine coated surface with VEGF loaded heparin/poly-L-lysine particles for anticoagulation and accelerate in situ endothelialization. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, n/a-n/a. doi:10.1002/jbm.a.35339
- Liu, Y. X., He, T., & Gao, C. Y. (2005). Surface modification of poly(ethylene terephthalate) via hydrolysis and layer-by-layer assembly of chitosan and chondroitin sulfate to construct cytocompatible layer for human endothelial cells. *Colloids and Surfaces, B: Biointerfaces*, 46(2), 117-126. doi:10.1016/j.colsurfb.2005.09.005
- López Jaramillo, F. J., Hernández Mateo, F., & Santoyo González, F. (2012). Vinyl sulfone: a multi-purpose function in proteomics. In H.-C. Leung (Ed.), *Integrative Proteomics: InTech*.
- Luo, R., Tang, L., Wang, J., Zhao, Y., Tu, Q., Weng, Y., . . . Huang, N. (2013). Improved immobilization of biomolecules to quinone-rich polydopamine for efficient surface functionalization. *Colloids and Surfaces, B: Biointerfaces*, 106(0), 66-73. doi:10.1016/j.colsurfb.2013.01.033
- Ma, Z. W., Mao, Z. W., & Gao, C. Y. (2007). Surface modification and property analysis of biomedical polymers used for tissue engineering. *Colloids and Surfaces, B: Biointerfaces*, 60(2), 137-157. doi:10.1016/j.colsurfb.2007.06.019
- Maheshwari, G., Brown, G., Lauffenburger, D. A., Wells, A., & Griffith, L. G. (2000). Cell adhesion and motility depend on nanoscale RGD clustering. *Journal of Cell Science*, 113 (Pt 10)(10), 1677-1686. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10769199>
- Makohliso, S. A., & Melchionna, S. (2001). Molecular characterization of a laminin-derived oligopeptide with implications in biomimetic applications. *Biophysical Chemistry*, 89(2-3), 129-144. doi:10.1016/S0301-4622(00)00223-4
- Marchand-Brynaert, J., Deldime, M., Dupont, I., Dewez, J. L., & Schneider, Y. J. (1995). Surface functionalization of poly(ethylene terephthalate) film and membrane by controlled wet chemistry: Chemical characterization of carboxylated surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science*, 173(1), 236-244. doi:10.1006/jcis.1995.1319

- Martino, M. M., Brkic, S., Bovo, E., Burger, M., Schäfer, D. J., Wolff, T., . . . Banfi, A. (2015). Extracellular matrix and growth factor engineering for controlled angiogenesis in regenerative medicine. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 3. doi:10.3389/fbioe.2015.00045
- Martwiset, S., Koh, A. E., & Chen, W. (2006). Nonfouling Characteristics of Dextran-Containing Surfaces. *Langmuir*, 22(19), 8192-8196. doi:10.1021/la061064b
- Mason, J. M., & Arndt, K. M. (2004). Coiled Coil Domains: Stability, Specificity, and Biological Implications. *ChemBioChem*, 5(2), 170-176. doi:10.1002/cbic.200300781
- Massia, S. P., & Hubbell, J. A. (1990). Covalent surface immobilization of Arg-Gly-Asp- and Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg-containing peptides to obtain well-defined cell-adhesive substrates. *Analytical Biochemistry*, 187(2), 292-301. doi:10.1016/0003-2697(90)90459-M
- Massia, S. P., & Hubbell, J. A. (1991). An RGD spacing of 440 nm is sufficient for integrin alpha V beta 3-mediated fibroblast spreading and 140 nm for focal contact and stress fiber formation. *Journal of Cell Biology*, 114(5), 1089-1100. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1714913>
- Massia, S. P., & Hubbell, J. A. (1992). Vascular Endothelial-Cell Adhesion and Spreading Promoted by the Peptide Redv of the Iiics Region of Plasma Fibronectin Is Mediated by Integrin Alpha-4-Beta-1. *Journal of Biological Chemistry*, 267(20), 14019-14026. Retrieved from <Go to ISI>://WOS:A1992JD32500039
- Massia, S. P., Rao, S. S., & Hubbell, J. A. (1993). Covalently immobilized laminin peptide Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg (YIGSR) supports cell spreading and co-localization of the 67-kilodalton laminin receptor with alpha-actinin and vinculin. *Journal of Biological Chemistry*, 268(11), 8053-8059. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8463322>
- Masters, K. S. (2011). Covalent Growth Factor Immobilization Strategies for Tissue Repair and Regeneration. *Macromolecular Bioscience*, 11(9), 1149-1163. doi:10.1002/mabi.201000505
- Matsuda, T., Kuwana, M., Aomizu, T., Yamagishi, M., Ohtake, H., & Watanabe, G. (2013). Surface design for in situ capture of endothelial progenitor cells: VEGF-bound surface architecture and behaviors of cultured mononuclear cells. *Journal of Biomedical Materials Research, Part B: Applied Biomaterials*, 101B(1), 50-60. doi:10.1002/jbm.b.32812
- McAllister, T. N., Maruszewski, M., Garrido, S. A., Wystrychowski, W., Dusserre, N., Marini, A., . . . L'Heureux, N. (2009). Effectiveness of haemodialysis access with an autologous tissue-engineered vascular graft: a multicentre cohort study. *Lancet*, 373(9673), 1440-1446. doi:10.1016/s0140-6736(09)60248-8
- McArthur, S. L., McLean, K. M., Kingshott, P., St John, H. A. W., Chatelier, R. C., & Griesser, H. J. (2000). Effect of polysaccharide structure on protein adsorption. *Colloids and Surfaces, B: Biointerfaces*, 17(1), 37-48. doi:10.1016/S0927-7765(99)00086-7
- McMillan, R., Meeks, B., Bensebaa, F., Deslandes, Y., & Sheardown, H. (2001). Cell adhesion peptide modification of gold-coated polyurethanes for vascular endothelial cell adhesion. *Journal of Biomedical Materials Research*, 54(2), 272-283. doi:10.1002/1097-4636(200102)54:2<272::aid-jbm15>3.0.co;2-3

- Mehta, R. I., Mukherjee, A. K., Patterson, T. D., & Fishbein, M. C. (2011). Pathology of explanted polytetrafluoroethylene vascular grafts. *Cardiovascular Pathology*, 20(4), 213-221. doi:10.1016/j.carpath.2010.06.005
- Melchiorri, A. J., Hibino, N., & Fisher, J. P. (2013). Strategies and techniques to enhance the in situ endothelialization of small-diameter biodegradable polymeric vascular grafts. *Tissue Engineering. Part B: Reviews*, 19(4), 292-307. doi:10.1089/ten.TEB.2012.0577
- Mergy, J., Fournier, A., Hachet, E., & Auzély-Velty, R. (2012). Modification of polysaccharides via thiol-ene chemistry: A versatile route to functional biomaterials. *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry*, 50(19), 4019-4028. doi:10.1002/pola.26201
- Michel, R., Pasche, S., Textor, M., & Castner, D. G. (2005). Influence of PEG Architecture on Protein Adsorption and Conformation. *Langmuir*, 21(26), 12327-12332. doi:10.1021/la051726h
- Miranda, K. M., Espey, M. G., & Wink, D. A. (2001). A Rapid, Simple Spectrophotometric Method for Simultaneous Detection of Nitrate and Nitrite. *Nitric Oxide*, 5(1), 62-71. doi:10.1006/niox.2000.0319
- Mitra, S. K., Hanson, D. A., & Schlaepfer, D. D. (2005). Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(1), 56-68. doi:10.1038/nrm1549
- Miyagi, Y., Chiu, L. L. Y., Cimini, M., Weisel, R. D., Radisic, M., & Li, R.-K. (2011). Biodegradable collagen patch with covalently immobilized VEGF for myocardial repair. *Biomaterials*, 32(5), 1280-1290. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.10.007
- Mohebbi-Kalhari, D., Rukhlova, M., Ajji, A., Bureau, M., & Moreno, M. J. (2012). A novel automated cell-seeding device for tissue engineering of tubular scaffolds: design and functional validation. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 6(9), 710-720. doi:10.1002/term.476
- Moiseeva, E. P. (2001). Adhesion receptors of vascular smooth muscle cells and their functions. *Cardiovascular Research*, 52(3), 372-386. doi:10.1016/s0008-6363(01)00399-6
- Monchaux, E., & Vermette, P. (2007). Bioactive Microarrays Immobilized on Low-Fouling Surfaces to Study Specific Endothelial Cell Adhesion. *Biomacromolecules*, 8(11), 3668-3673. doi:10.1021/bm7007907
- Monchaux, E., & Vermette, P. (2008). Cell adhesion resistance mechanisms using arrays of dextran-derivative layers. *Journal of Biomedical Materials Research, Part A*, 85A(4), 1052-1063. doi:10.1002/jbm.a.31580
- Morales-Sanfrutos, J., Lopez-Jaramillo, J., Ortega-Munoz, M., Megia-Fernandez, A., Perez-Balderas, F., Hernandez-Mateo, F., & Santoyo-Gonzalez, F. (2010). Vinyl sulfone: a versatile function for simple bioconjugation and immobilization. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 8(3), 667-675. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1039/B920576D>
- Moreno, M. J., Ajji, A., Mohebbi-Kalhari, D., Rukhlova, M., Hadjizadeh, A., & Bureau, M. N. (2011). Development of a compliant and cytocompatible micro-fibrous polyethylene terephthalate vascular scaffold. *Journal of Biomedical Materials Research, Part B: Applied Biomaterials*, 97B(2), 201-214. doi:10.1002/jbm.b.31774

- Morpurgo, M., Veronese, F. M., Kachensky, D., & Harris, J. M. (1996). Preparation and Characterization of Poly(ethylene glycol) Vinyl Sulfone. *Bioconjugate Chemistry*, 7(3), 363-368. doi:10.1021/bc9600224
- Moss, A. J., Sharma, S., & Brindle, N. P. J. (2009). Rational design and protein engineering of growth factors for regenerative medicine and tissue engineering. *Biochemical Society Transactions*, 37, 717-721. doi:10.1042/Bst0370717
- Mozaffarian, D., Benjamin, E. J., Go, A. S., Arnett, D. K., Blaha, M. J., Cushman, M., . . . Turner, M. B. (2015). Heart Disease and Stroke Statistics—2015 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*, 131(4), e29-e322. doi:10.1161/cir.0000000000000152
- Murschel, F., Liberelle, B., St-Laurent, G., Jolicoeur, M., Durocher, Y., & De Crescenzo, G. (2013). Coiled-coil-mediated grafting of bioactive vascular endothelial growth factor. *Acta Biomaterialia*, 9(6), 6806-6813. doi:10.1016/j.actbio.2013.02.032
- Muthuvijayan, V., Gu, J., & Lewis, R. S. (2009). Analysis of functionalized polyethylene terephthalate with immobilized NTPDase and cysteine. *Acta Biomaterialia*, 5(9), 3382-3393. doi:10.1016/j.actbio.2009.05.020
- Nachman, R. L. (2012). Endothelium: from cellophane to orchestral maestro. *The Journal of Clinical Investigation*, 122(3), 796-797. doi:10.1172/jci62589
- Nachman, R. L., & Jaffe, E. A. (2004). Endothelial cell culture: beginnings of modern vascular biology. *Journal of Clinical Investigation*, 114(8), 1037-1040. doi:10.1172/jci23284
- Napoli, C., & Ignarro, L. (2009). Nitric oxide and pathogenic mechanisms involved in the development of vascular diseases. *Archives of Pharmacal Research*, 32(8), 1103-1108. doi:10.1007/s12272-009-1801-1
- Neff, L. P., Tillman, B. W., Yazdani, S. K., Machingal, M. A., Yoo, J. J., Soker, S., . . . Christ, G. J. (2011). Vascular smooth muscle enhances functionality of tissue-engineered blood vessels in vivo. *Journal of Vascular Surgery*, 53(2), 426-434. doi:10.1016/j.jvs.2010.07.054
- Nemeno-Guanzon, J. G., Lee, S., Berg, J. R., Jo, Y. H., Yeo, J. E., Nam, B. M., . . . Lee, J. I. (2012). Trends in Tissue Engineering for Blood Vessels. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012, 14. doi:10.1155/2012/956345
- Ng, R., Zhang, X. D., Liu, N., & Yang, S. T. (2009). Modifications of nonwoven polyethylene terephthalate fibrous matrices via NaOH hydrolysis: Effects on pore size, fiber diameter, cell seeding and proliferation. *Process Biochemistry*, 44(9), 992-998. doi:10.1016/j.procbio.2009.04.024
- Ni, H. Y., & Freedman, J. (2003). Platelets in hemostasis and thrombosis: role of integrins and their ligands. *Transfusion and Apheresis Science*, 28(3), 257-264. doi:10.1016/S1473-0502(03)00044-2
- Nissen, K. E., Stuart, B. H., Stevens, M. G., & Baker, A. T. (2008). Characterization of aminated poly(ethylene terephthalate) surfaces for biomedical applications. *Journal of Applied Polymer Science*, 107(4), 2394-2403. doi:10.1002/app.27145

- Noel, S., Hachem, A., Merhi, Y., & De Crescenzo, G. (2015). Development of a polyester coating combining anti-thrombogenic and cell adhesive properties - Influence of sequence and surface density of adhesion peptides. *Biomacromolecules*. doi:10.1021/acs.biomac.5b00219
- Noel, S., Liberelle, B., Robitaille, L., & De Crescenzo, G. (2011). Quantification of primary amine groups available for subsequent biofunctionalization of polymer surfaces. *Bioconjugate Chemistry*, 22(8), 1690-1699. doi:10.1021/bc200259c
- Noel, S., Liberelle, B., Yogi, A., Moreno, M. J., Bureau, M. N., Robitaille, L., & De Crescenzo, G. (2013). A non-damaging chemical amination protocol for poly(ethylene terephthalate) - application to the design of functionalized compliant vascular grafts. *Journal Of Materials Chemistry B*, 1(2), 230-238. doi:10.1039/c2tb00082b
- Nottelet, B., Pektok, E., Mandracchia, D., Tille, J. C., Walpoth, B., Gurny, R., & Möller, M. (2009). Factorial design optimization and in vivo feasibility of poly(ϵ -caprolactone)-micro- and nanofiber-based small diameter vascular grafts. *Journal of Biomedical Materials Research, Part A*, 89A(4), 865-875. doi:10.1002/jbm.a.32023
- O'Brien, J., Wilson, I., Orton, T., & Pognan, F. (2000). Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European Journal of Biochemistry*, 267(17), 5421-5426. doi:10.1046/j.1432-1327.2000.01606.x
- Odedra, D., Chiu, L. L., Shoichet, M., & Radisic, M. (2011). Endothelial cells guided by immobilized gradients of vascular endothelial growth factor on porous collagen scaffolds. *Acta Biomaterialia*, 7(8), 3027-3035. doi:10.1016/j.actbio.2011.05.002
- Oliviero, O., Ventre, M., & Netti, P. A. (2012). Functional porous hydrogels to study angiogenesis under the effect of controlled release of vascular endothelial growth factor. *Acta Biomaterialia*, 8(9), 3294-3301. doi:10.1016/j.actbio.2012.05.019
- Olsson, A.-K., Dimberg, A., Kreuger, J., & Claesson-Welsh, L. (2006). VEGF receptor signalling ? in control of vascular function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(5), 359-371. doi:10.1038/nrm1911
- Österberg, E., Bergström, K., Holmberg, K., Riggs, J. A., Van Alstine, J. M., Schuman, T. P., . . . Harris, J. M. (1993). Comparison of polysaccharide and poly(ethylene glycol) coatings for reduction of protein adsorption on polystyrene surfaces. *Colloids and Surfaces, A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 77(2), 159-169. doi:10.1016/0927-7757(93)80112-R
- Öteyaka, M., Chevallier, P., Turgeon, S., Robitaille, L., & Laroche, G. (2012). Low Pressure Radio Frequency Ammonia Plasma Surface Modification on Poly(ethylene terephthalate) Films and Fibers: Effect of the Polymer Forming Process. *Plasma Chemistry and Plasma Processing*, 32(1), 17-33. doi:10.1007/s11090-011-9330-3
- Ozawa, C. R., Banfi, A., Glazer, N. L., Thurston, G., Springer, M. L., Kraft, P. E., . . . Blau, H. M. (2004). Microenvironmental VEGF concentration, not total dose, determines a threshold between normal and aberrant angiogenesis. *The Journal of Clinical Investigation*, 113(4), 516-527. doi:10.1172/jci18420

- Palecek, S. P., Loftus, J. C., Ginsberg, M. H., Lauffenburger, D. A., & Horwitz, A. F. (1997). Integrin-ligand binding properties govern cell migration speed through cell-substratum adhesiveness. *Nature*, 385(6616), 537-540. doi:10.1038/385537a0
- Pankajakshan, D., & Agrawal, D. K. (2010). Scaffolds in tissue engineering of blood vessels. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 88(9), 855-873. doi:10.1139/y10-073
- Pardo, A. M. P., Bryhan, M., Krasnow, H., Hardin, N., Riddle, M., LaChance, O., . . . Hoover, D. S. (2005). Corning® CellBIND® Surface: An Improved Surface for Enhanced Cell Attachment. *Corning Life Sciences Technical Monograph CLS-AN-0057 Rev1*. Retrieved from http://csmedia2.corning.com/LifeSciences/Media/pdf/t_CellBIND_Improved_Surface_CLS_AN_057.pdf
- Park, C., Hong, Y., Park, K., & Han, D. (2010). Peptide-grafted lactide-based poly(ethylene glycol) porous scaffolds for specific cell adhesion. *Macromolecular Research*, 18(5), 526-532. doi:10.1007/s13233-010-0517-9
- Peck, M., Gebhart, D., Dusserre, N., McAllister, T. N., & L'Heureux, N. (2012). The evolution of vascular tissue engineering and current state of the art. *Cells Tissues Organs*, 195(1-2), 144-158. doi:10.1159/000331406
- Pelton, R. (2014). Polyvinylamine: A Tool for Engineering Interfaces. *Langmuir*, 30(51), 15373-15382. doi:10.1021/la5017214
- Phelps, E. A., Headen, D. M., Taylor, W. R., Thulé, P. M., & García, A. J. (2013). Vasculogenic bio-synthetic hydrogel for enhancement of pancreatic islet engraftment and function in type 1 diabetes. *Biomaterials*, 34(19), 4602-4611. doi:10.1016/j.biomaterials.2013.03.012
- Place, E. S., Evans, N. D., & Stevens, M. M. (2009). Complexity in biomaterials for tissue engineering. *Nature Materials*, 8(6), 457-470. doi:10.1038/Nmat2441
- Place, E. S., George, J. H., Williams, C. K., & Stevens, M. M. (2009). Synthetic polymer scaffolds for tissue engineering. *Chemical Society Reviews*, 38(4), 1139-1151. doi:10.1039/b811392k
- Plouffe, B. D., Njoka, D. N., Harris, J., Liao, J., Horick, N. K., Radisic, M., & Murthy, S. K. (2007). Peptide-Mediated Selective Adhesion of Smooth Muscle and Endothelial Cells in Microfluidic Shear Flow. *Langmuir*, 23(9), 5050-5055. doi:10.1021/la0700220
- Plouffe, B. D., Radisic, M., & Murthy, S. K. (2008). Microfluidic depletion of endothelial cells, smooth muscle cells, and fibroblasts from heterogeneous suspensions. *Lab on a Chip*, 8(3), 462-472. doi:10.1039/b715707j
- Poh, C. K., Shi, Z., Lim, T. Y., Neoh, K. G., & Wang, W. (2010). The effect of VEGF functionalization of titanium on endothelial cells in vitro. *Biomaterials*, 31(7), 1578-1585. doi:10.1016/j.biomaterials.2009.11.042
- Porter, A. M., Klinge, C. M., & Gobin, A. S. (2011a). Biomimetic hydrogels with VEGF induce angiogenic processes in both hUVEC and hMEC. *Biomacromolecules*, 12(1), 242-246. doi:10.1021/bm101220b

- Porter, A. M., Klinge, C. M., & Gobin, A. S. (2011b). Covalently grafted VEGF(165) in hydrogel models upregulates the cellular pathways associated with angiogenesis. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 301(5), C1086-1092. doi:10.1152/ajpcell.00090.2011
- Rahmany, M. B., & Van Dyke, M. (2013). Biomimetic approaches to modulate cellular adhesion in biomaterials: A review. *Acta Biomaterialia*, 9(3), 5431-5437. doi:10.1016/j.actbio.2012.11.019
- Rampersad, S. N. (2012). Multiple Applications of Alamar Blue as an Indicator of Metabolic Function and Cellular Health in Cell Viability Bioassays. *Sensors*, 12(9), 12347-12360. doi:10.3390/s120912347
- Randone, B., Cavallaro, G., Polistena, A., Cucina, A., Coluccia, P., Graziano, P., & Cavallaro, A. (2005). Dual Role of VEGF in Pretreated Experimental ePTFE Arterial Grafts. *Journal of Surgical Research*, 127(2), 70-79. doi:10.1016/j.jss.2004.09.005
- Rémy, M., Bareille, R., Rerat, V., Bourget, C., Marchand-Brynaert, J., & Bordenave, L. (2012). Polyethylene terephthalate membrane grafted with peptidomimetics: endothelial cell compatibility and retention under shear stress. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 1-18. doi:10.1080/09205063.2012.690275
- Ren, X., Feng, Y., Guo, J., Wang, H., Li, Q., Yang, J., . . . Li, W. (2015). Surface modification and endothelialization of biomaterials as potential scaffolds for vascular tissue engineering applications. *Chemical Society Reviews*. doi:10.1039/C4CS00483C
- Renken, A., & Hunkeler, D. (2007). Polyvinylamine-based capsules: A mechanistic study of the formation using alginate and cellulose sulphate. *Journal of Microencapsulation*, 24(4), 323-336. doi:10.1080/02652040601162350
- Rice, J. J., Martino, M. M., De Laporte, L., Tortelli, F., Briquez, P. S., & Hubbell, J. A. (2013). Engineering the Regenerative Microenvironment with Biomaterials. *Advanced Healthcare Materials*, 2(1), 57-71. doi:10.1002/adhm.201200197
- Roger, V. L., Go, A. S., Lloyd-Jones, D. M., Adams, R. J., Berry, J. D., Brown, T. M., . . . Wylie-Rosett, J. (2011). Heart disease and stroke statistics - 2011 update: A report from the american heart association. *Circulation*, 123(4), e18-209. doi:10.1161/CIR.0b013e3182009701
- Rosés, M. (2004). Determination of the pH of binary mobile phases for reversed-phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1037(1-2), 283-298. doi:10.1016/j.chroma.2003.12.063
- Ross, R. S. (2004). Molecular and mechanical synergy: cross-talk between integrins and growth factor receptors. *Cardiovascular Research*, 63(3), 381-390. doi:10.1016/j.cardiores.2004.04.027
- Salacinski, H. J., Goldner, S., Giudiceandrea, A., Hamilton, G., Seifalian, A. M., Edwards, A., & Carson, R. J. (2001). The mechanical behavior of vascular grafts: A review. *Journal of Biomaterials Applications*, 15(3), 241-278. doi:10.1106/na5t-j57a-jtdd-fd04
- Salacinski, H. J., Tai, N. R., Carson, R. J., Edwards, A., Hamilton, G., & Seifalian, A. M. (2002). In vitro stability of a novel compliant poly(carbonate-urea)urethane to oxidative and

- hydrolytic stress. *Journal of Biomedical Materials Research*, 59(2), 207-218. doi:10.1002/jbm.1234
- Sarkar, S., Hillery, C., Seifalian, A., & Hamilton, G. (2006). Critical parameter of burst pressure measurement in development of bypass grafts is highly dependent on methodology used. *Journal of Vascular Surgery*, 44(4), 846-852. doi:10.1016/j.jvs.2006.07.023
- Satomi, T., Nagasaki, Y., Kobayashi, H., Otsuka, H., & Kataoka, K. (2007). Density Control of Poly(ethylene glycol) Layer To Regulate Cellular Attachment. *Langmuir*, 23(12), 6698-6703. doi:10.1021/la0624384
- Savoji, H., Hadjizadeh, A., Maire, M., Ajji, A., Wertheimer, M. R., & Lerouge, S. (2014). Electrospun Nanofiber Scaffolds and Plasma Polymerization: A Promising Combination Towards Complete, Stable Endothelial Lining for Vascular Grafts. *Macromolecular Bioscience*, 14(8), 1084-1095. doi:10.1002/mabi.201300545
- Schaff, M., Tang, C., Maurer, E., Bourdon, C., Receveur, N., Eckly, A., . . . Mangin, P. H. (2013). Integrin $\alpha\beta 1$ Is the Main Receptor for Vascular Laminins and Plays a Role in Platelet Adhesion, Activation, and Arterial Thrombosis. *Circulation*, 128(5), 541-552. doi:10.1161/circulationaha.112.000799
- Schmedlen, R. H., Elbjerrami, W. M., Gobin, A. S., & West, J. L. (2006). Tissue engineered vascular grafts. In J. D. Bronzino (Ed.), *Tissue engineering and artificial organs* (3rd ed., Vol. 3, pp. 1-13): CRC/Taylor & Francis.
- Schmidt, D. R., Waldeck, H., & Kao, W. J. (2009). Protein Adsorption to Biomaterials. In D. A. Puleo & R. Bizios (Eds.), *Biological Interactions on Materials Surfaces* (pp. 1-18): Springer US.
- Schröder, K., Meyer-Plath, A., Keller, D., Besch, W., Babucke, G., & Ohl, A. (2001). Plasma-induced surface functionalization of polymeric biomaterials in ammonia plasma. *Contributions to Plasma Physics*, 41(6), 562-572. doi:10.1002/1521-3986(200111)41:6<562::aid-ctpp562>3.0.co;2-y
- Seifalian, A. M., Salacinski, H. J., Punshon, G., Krijgsman, B., & Hamilton, G. (2001). A new technique for measuring the cell growth and metabolism of endothelial cells seeded on vascular prostheses. *Journal of Biomedical Materials Research*, 55(4), 637-644. doi:10.1002/1097-4636(20010615)55:4<637::aid-jbm1058>3.0.co;2-z
- Seifalian, A. M., Tiwari, A., Hamilton, G., & Salacinski, H. J. (2002). Improving the clinical patency of prosthetic vascular and coronary bypass grafts: The role of seeding and tissue engineering. *Artificial Organs*, 26(4), 307-320. doi:10.1046/j.1525-1594.2002.06841.x
- Seifu, D. G., Purnama, A., Mequanint, K., & Mantovani, D. (2013). Small-diameter vascular tissue engineering. *Nature Reviews. Cardiology*, 10(7), 410-421. doi:10.1038/nrcardio.2013.77
- Shafer, D. E., Inman, J. K., & Lees, A. (2000). Reaction of Tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) with Maleimide and α -Haloacyl Groups: Anomalous Elution of TCEP by Gel Filtration. *Analytical Biochemistry*, 282(1), 161-164. doi:10.1006/abio.2000.4609
- Shahal, T., Geiger, B., Dunlop, I., & Spatz, J. (2012). Regulation of Integrin Adhesions by Varying the Density of Substrate-Bound Epidermal Growth Factor. *Biointerphases*, 7(1-4), 1-11. doi:10.1007/s13758-012-0023-0

- Sharon, J. L., & Puleo, D. A. (2008). Immobilization of glycoproteins, such as VEGF, on biodegradable substrates. *Acta Biomaterialia*, 4(4), 1016-1023. doi:10.1016/j.actbio.2008.02.017
- Shen, Y. H., Shoichet, M. S., & Radisic, M. (2008). Vascular endothelial growth factor immobilized in collagen scaffold promotes penetration and proliferation of endothelial cells. *Acta Biomaterialia*, 4(3), 477-489. doi:10.1016/j.actbio.2007.12.011
- Shin, H., Jo, S., & Mikos, A. G. (2003). Biomimetic materials for tissue engineering. *Biomaterials*, 24(24), 4353-4364. doi:10.1016/S0142-9612(03)00339-9
- Shin, Y. M., Lee, Y. B., Kim, S. J., Kang, J. K., Park, J.-C., Jang, W., & Shin, H. (2012). Mussel-Inspired Immobilization of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) for Enhanced Endothelialization of Vascular Grafts. *Biomacromolecules*, 13(7), 2020-2028. doi:10.1021/bm300194b
- Siow, K. S., Britcher, L., Kumar, S., & Griesser, H. J. (2006). Plasma methods for the generation of chemically reactive surfaces for biomolecule immobilization and cell colonization: A review. *Plasma Processes and Polymers*, 3(6-7), 392-418. doi:10.1002/ppap.200600021
- Somanath, P., Ciocea, A., & Byzova, T. (2009). Integrin and Growth Factor Receptor Alliance in Angiogenesis. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 53(2), 53-64. doi:10.1007/s12013-008-9040-5
- Sorrentino, S., & Haller, H. (2011). Tissue Engineering of Blood Vessels: How to Make a Graft *Tissue Engineering* (pp. 263-278): Springer.
- Staton, C. A., Reed, M. W. R., & Brown, N. J. (2009). A critical analysis of current in vitro and in vivo angiogenesis assays. *International Journal of Experimental Pathology*, 90(3), 195-221. doi:10.1111/j.1365-2613.2008.00633.x
- Stegemann, J. P., Kaszuba, S. N., & Rowe, S. L. (2007). Review: advances in vascular tissue engineering using protein-based biomaterials. *Tissue Engineering*, 13(11), 2601-2613. doi:10.1089/ten.2007.0196
- Stewart, S. F. C., & Lyman, D. J. (1990). Predicting the compliance of small diameter vascular grafts from uniaxial tensile tests. *Journal of Biomechanics*, 23(7), 629-637. doi:10.1016/0021-9290(90)90162-v
- Sumaru, K., Matsuoka, H., & Yamaoka, H. (1996). Exact evaluation of characteristic protonation of poly(vinylamine) in aqueous solution. *Journal of Physical Chemistry*, 100(21), 9000-9005. doi:10.1021/jp953385u
- Taguchi, T., Kishida, A., Akashi, M., & Maruyama, I. (2000). Immobilization of Human Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF165) onto Biomaterials: An Evaluation of the Biological Activity of Immobilized VEGF165. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 15(4), 309-320. doi:10.1177/088391150001500403
- Tai, N. R., Salacinski, H. J., Edwards, A., Hamilton, G., & Seifalian, A. M. (2000). Compliance properties of conduits used in vascular reconstruction. *British Journal of Surgery*, 87(11), 1516-1524. doi:10.1046/j.1365-2168.2000.01566.x
- Taite, L. J., Yang, P., Jun, H.-W., & West, J. L. (2008). Nitric oxide-releasing polyurethane-PEG copolymer containing the YIGSR peptide promotes endothelialization with decreased

- platelet adhesion. *Journal of Biomedical Materials Research, Part B: Applied Biomaterials*, 84B(1), 108-116. doi:10.1002/jbm.b.30850
- Tandon, N. N., Holland, E. A., Kralisz, U., Kleinman, H. K., Robey, F. A., & Jamieson, G. A. (1991). Interaction of human platelets with laminin and identification of the 67 kDa laminin receptor on platelets. *Biochemical Journal*, 274 (Pt 2), 535-542.
- Thalla, P. K., Contreras-Garcia, A., Fadlallah, H., Barrette, J., De Crescenzo, G., Merhi, Y., & Lerouge, S. (2013). A versatile star PEG grafting method for the generation of nonfouling and nonthrombogenic surfaces. *BioMed Research International*, 2013, 962376. doi:10.1155/2013/962376
- Thalla, P. K., Fadlallah, H., Liberelle, B., Lequoy, P., De Crescenzo, G., Merhi, Y., & Lerouge, S. (2014). Chondroitin Sulfate Coatings Display Low Platelet but High Endothelial Cell Adhesive Properties Favorable for Vascular Implants. *Biomacromolecules*, 15(7), 2512-2520. doi:10.1021/bm5003762
- Tiraferri, A., & Elimelech, M. (2012). Direct quantification of negatively charged functional groups on membrane surfaces. *Journal of Membrane Science*, 389(0), 499-508. doi:10.1016/j.memsci.2011.11.018
- Tiwari, A., Salacinski, H. J., Hamilton, G., & Seifalian, A. M. (2001). Tissue engineering of vascular bypass grafts: Role of endothelial cell extraction. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*, 21(3), 193-201. doi:10.1053/ejvs.2001.1316
- Traub, S., Morgner, J., Martino, M. M., Höning, S., Swartz, M. A., Wickström, S. A., . . . Eming, S. A. (2013). The promotion of endothelial cell attachment and spreading using FNIII10 fused to VEGF-A165. *Biomaterials*, 34(24), 5958-5968. doi:10.1016/j.biomaterials.2013.04.050
- Trzcinska, R., Balin, K., Kubacki, J., Marzec, M. E., Pedrys, R., Szade, J., . . . Trzebicka, B. (2014). Relevance of the Poly(ethylene glycol) Linkers in Peptide Surfaces for Proteases Assays. *Langmuir*, 30(17), 5015-5025. doi:10.1021/la500457q
- Unsworth, L. D., Sheardown, H., & Brash, J. L. (2005). Protein Resistance of Surfaces Prepared by Sorption of End-Thiolated Poly(ethylene glycol) to Gold: Effect of Surface Chain Density. *Langmuir*, 21(3), 1036-1041. doi:10.1021/la047672d
- Unsworth, L. D., Sheardown, H., & Brash, J. L. (2008). Protein-resistant poly(ethylene oxide)-grafted surfaces: Chain density-dependent multiple mechanisms of action. *Langmuir*, 24(5), 1924-1929. doi:10.1021/La702310t
- van Lith, R., & Ameer, G. A. (2011). Biohybrid strategies for vascular grafts *Tissue Engineering* (pp. 279-316): Springer.
- Vara, D. S., Salacinski, H. J., Kannan, R. Y., Bordenave, L., Hamilton, G., & Seifalian, A. M. (2005). Cardiovascular tissue engineering: state of the art. *Pathologie Biologie*, 53(10), 599-612. doi:10.1016/j.patbio.2004.12.006
- Ventre, M., Causa, F., & Netti, P. A. (2012). Determinants of cell-material crosstalk at the interface: towards engineering of cell instructive materials. *Journal of the Royal Society, Interface*, 9(74), 2017-2032. doi:10.1098/rsif.2012.0308

- Ventre, M., Netti, P. A., Urciuolo, F., & Ambrosio, L. (2009). Soft tissues characteristics and strategies for their replacement and regeneration. In M. Santin (Ed.), *Strategies in Regenerative Medicine* (pp. 1-40). New York: Springer.
- Vindigni, V., Abatangelo, G., & Bassetto, F. (2011). New Developments in Tissue Engineering of Microvascular Prostheses. In R. Pignatello (Ed.), *Biomaterials Science and Engineering InTech*.
- Wallace, C. S., & Truskey, G. A. (2010). Direct-contact co-culture between smooth muscle and endothelial cells inhibits TNF- α -mediated endothelial cell activation. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 299(2), H338-H346. doi:10.1152/ajpheart.01029.2009
- Walpoth, B. H., & Bowlin, G. L. (2005). The daunting quest for a small diameter vascular graft. *Expert Review of Medical Devices*, 2(6), 647-651. doi:10.1586/17434440.2.6.647
- Wang, H. G., Yin, T. Y., Ge, S. P., Zhang, Q., Dong, Q. L., Lei, D. X., . . . Wang, G. X. (2013). Biofunctionalization of titanium surface with multilayer films modified by heparin-VEGF-fibronectin complex to improve endothelial cell proliferation and blood compatibility. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 101A(2), 413-420. doi:10.1002/jbm.a.34339
- Wang, W., Guo, L., Yu, Y., Chen, Z., Zhou, R., & Yuan, Z. (2015). Peptide REDV-modified polysaccharide hydrogel with endothelial cell selectivity for the promotion of angiogenesis. *Journal of Biomedical Materials Research, Part A*, 103(5), 1703-1712. doi:10.1002/jbm.a.35306
- Wang, Z., He, Y., Yu, X., Fu, W., Wang, W., & Huang, H. (2012). Rapid vascularization of tissue-engineered vascular grafts in vivo by endothelial cells in co-culture with smooth muscle cells. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 23(4), 1109-1117. doi:10.1007/s10856-012-4576-8
- Wei, Y., Ji, Y., Xiao, L.-L., Lin, Q.-k., Xu, J.-p., Ren, K.-f., & Ji, J. (2013). Surface engineering of cardiovascular stent with endothelial cell selectivity for in vivo re-endothelialisation. *Biomaterials*, 34(11), 2588-2599. doi:10.1016/j.biomaterials.2012.12.036
- Wei, Y., Ji, Y., Xiao, L., Lin, Q., & Ji, J. (2011). Different complex surfaces of polyethyleneglycol (PEG) and REDV ligand to enhance the endothelial cells selectivity over smooth muscle cells. *Colloids and Surfaces, B: Biointerfaces*, 84(2), 369-378. doi:10.1016/j.colsurfb.2011.01.028
- White, S. J., Morton, D. W. A., Cheah, B. C., Bronowska, A., Davies, A. G., Stockley, P. G., . . . Johnson, S. (2012). On-Surface Assembly of Coiled-Coil Heterodimers. *Langmuir*, 28(39), 13877-13882. doi:10.1021/la3025149
- Wu, P., Fu, Y., & Cai, K. (2014). Regulation of the migration of endothelial cells by a gradient density of vascular endothelial growth factor. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 123(0), 181-190. doi:10.1016/j.colsurfb.2014.09.013
- Xu, L.-C., Bauer, J. W., & Siedlecki, C. A. (2014). Proteins, platelets, and blood coagulation at biomaterial interfaces. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 124(0), 49-68. doi:10.1016/j.colsurfb.2014.09.040

- Yang, K., & Proweller, A. (2011). Vascular Smooth Muscle Notch Signals Regulate Endothelial Cell Sensitivity to Angiogenic Stimulation. *Journal of Biological Chemistry*, 286(15), 13741-13753. doi:10.1074/jbc.M110.181842
- Yang, Z., Tu, Q., Zhu, Y., Luo, R., Li, X., Xie, Y., . . . Huang, N. (2012). Mussel-inspired coating of polydopamine directs endothelial and smooth muscle cell fate for re-endothelialization of vascular devices. *Advanced Healthcare Materials*, 1(5), 548-559. doi:10.1002/adhm.201200073
- Yang, Z., Yang, Y., Yan, W., Tu, Q., Wang, J., & Huang, N. (2013). Construction of polyfunctional coatings assisted by gallic acid to facilitate co-immobilization of diverse biomolecules. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 5(21), 10495-10501. doi:10.1021/am403478k
- Yang, Z. L., Tu, Q. F., Wang, J., & Huang, N. (2012). The role of heparin binding surfaces in the direction of endothelial and smooth muscle cell fate and re-endothelialization. *Biomaterials*, 33(28), 6615-6625. doi:10.1016/j.biomaterials.2012.06.055
- Yu, M., Du, F., Ise, H., Zhao, W., Zhang, Y., Yu, Y., . . . Akaike, T. (2012). Preparation and characterization of a VEGF-Fc fusion protein matrix for enhancing HUVEC growth. *Biotechnology Letters*, 34(9), 1765-1771. doi:10.1007/s10529-012-0959-7
- Yu, Y., & Chau, Y. (2012). One-Step "Click" Method for Generating Vinyl Sulfone Groups on Hydroxyl-Containing Water-Soluble Polymers. *Biomacromolecules*, 13(3), 937-942. doi:10.1021/bm2014476
- Zachary, I., Mathur, A., Yla-Herttuala, S., & Martin, J. (2000). Vascular Protection : A Novel Nonangiogenic Cardiovascular Role for Vascular Endothelial Growth Factor. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 20(6), 1512-1520. doi:10.1161/01.atv.20.6.1512
- Zhang, H., Jia, X., Han, F., Zhao, J., Zhao, Y., Fan, Y., & Yuan, X. (2013). Dual-delivery of VEGF and PDGF by double-layered electrospun membranes for blood vessel regeneration. *Biomaterials*(0). doi:10.1016/j.biomaterials.2012.12.005
- Zhang, Y., Lim, C., Ramakrishna, S., & Huang, Z.-M. (2005). Recent development of polymer nanofibers for biomedical and biotechnological applications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 16(10), 933-946. doi:10.1007/s10856-005-4428-x
- Zhou, M., Liu, Z., Wei, Z., Liu, C., Qiao, T., Ran, F., . . . Ding, Y. (2009). Development and Validation of Small-diameter Vascular Tissue From a Decellularized Scaffold Coated With Heparin and Vascular Endothelial Growth Factor. *Artificial Organs*, 33(3), 230-239. doi:10.1111/j.1525-1594.2009.00713.x
- Zhu, B., Eurell, T., Gunawan, R., & Leckband, D. (2001). Chain-length dependence of the protein and cell resistance of oligo(ethylene glycol)-terminated self-assembled monolayers on gold. *Journal of Biomedical Materials Research*, 56(3), 406-416. doi:10.1002/1097-4636(20010905)56:3<406::aid-jbm1110>3.0.co;2-r
- Zhu, Y., Mao, Z. W., & Gao, C. Y. (2013). Aminolysis-based surface modification of polyesters for biomedical applications. *RSC Advances*, 3(8), 2509-2519. doi:10.1039/C2ra22358a

- Zilla, P., Bezuidenhout, D., & Human, P. (2007). Prosthetic vascular grafts: Wrong models, wrong questions and no healing. *Biomaterials*, 28(34), 5009-5027. doi:10.1016/j.biomaterials.2007.07.017
- Zisch, A. H., Lutolf, M. P., Ehrbar, M., Raeber, G. P., Rizzi, S. C., Davies, N., . . . Hubbell, J. A. (2003). Cell-demanded release of VEGF from synthetic, biointeractive cell-ingrowth matrices for vascularized tissue growth. *FASEB Journal*. doi:10.1096/fj.02-1041fje
- Zisch, A. H., Schenk, U., Schense, J. C., Sakiyama-Elbert, S. E., & Hubbell, J. A. (2001). Covalently conjugated VEGF--fibrin matrices for endothelialization. *Journal of Controlled Release*, 72(1-3), 101-113. doi:10.1016/S0168-3659(01)00266-8

ANNEXE A COMPARAISON POLYVINYLAMINE ET POLYALLYLAMINE

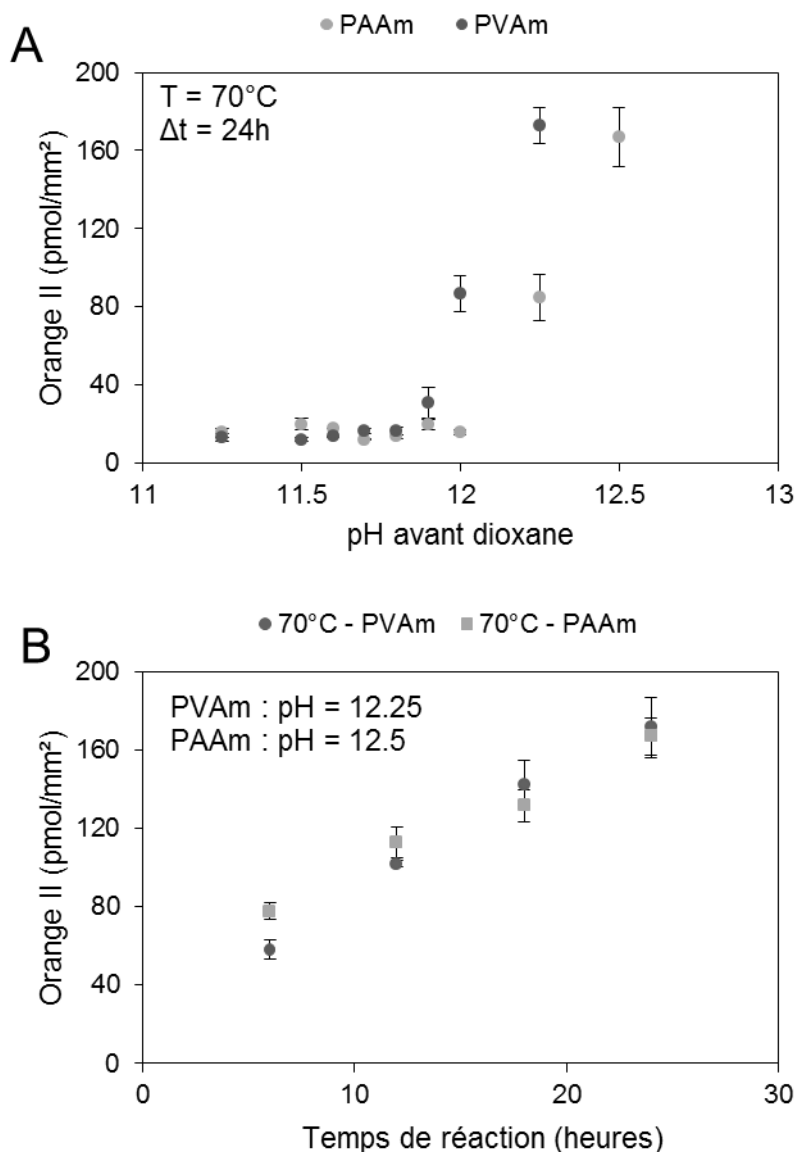


Figure annexe - 1 : Influence des paramètres de réaction sur le greffage de polyvinylamine (PVAm) et polyallylamine (PAAm) sur des films de PET. (A) Influence du pH : La température était de 70°C et le temps de réaction de 24h ; (B) Influence du temps et de la température à pH 12.25 pour le PVAm et 12.5 pour le PAAm. Pour les deux figures, le protocole correspond à celui décrit dans le Chapitre 4, avec 100 mM de NH₂ et 27% de dioxane dans le mélange final. La densité d'amines était mesurée par Orange II (Noel et al., 2011).

ANNEXE B INFORMATIONS SUPPLÉMENTAIRES AU CHAPITRE 5

En plus des informations supplémentaires ci-dessous ayant été publiées en complément de l'article, des expériences visant au transfert du revêtement aux structures non-tissées sont présentées en Annexe E1.

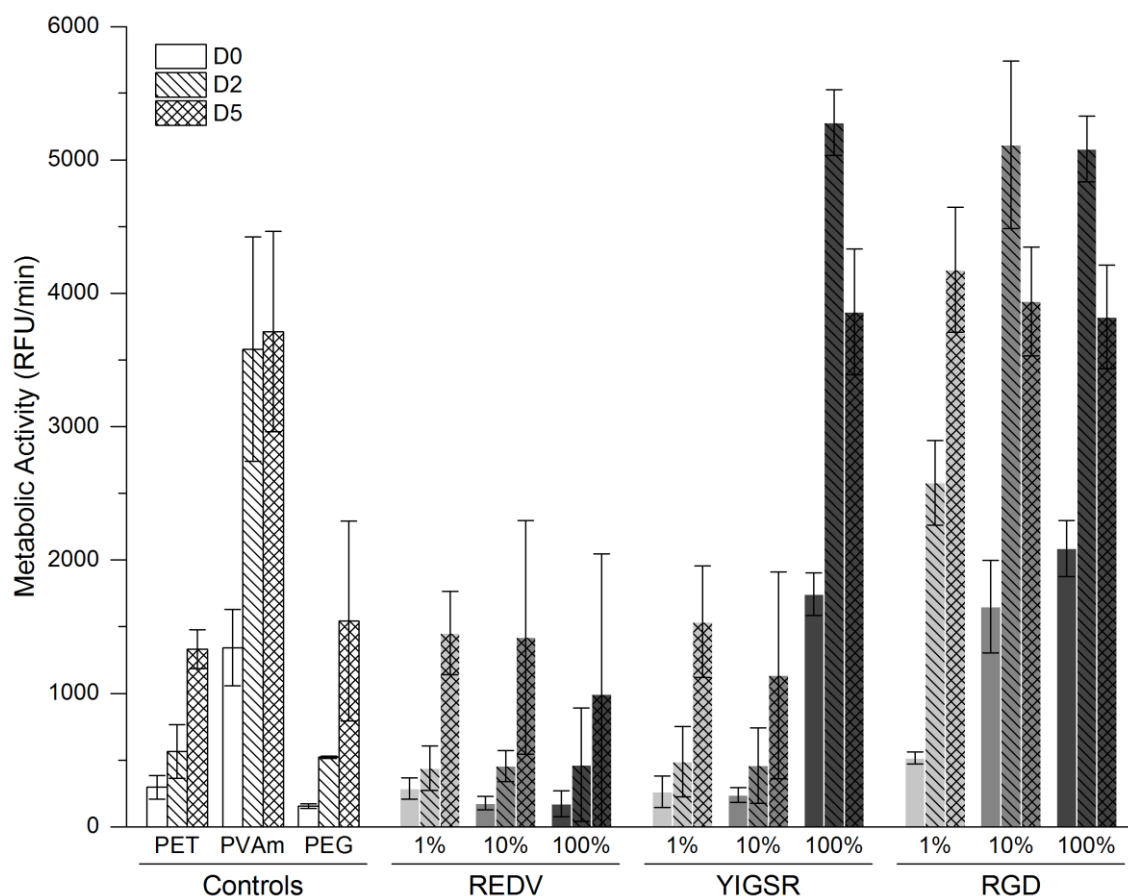


Figure annexe - 2 : HUVEC proliferation on peptide-functionalized PET films as determined by resazurin assay. The latter was performed one hour after HUVEC seeding (D0) and repeated on the same samples after two (D2) and five (D5) days in full medium. The experiment was done once on triplicates. ($n=3 \times N=1$).

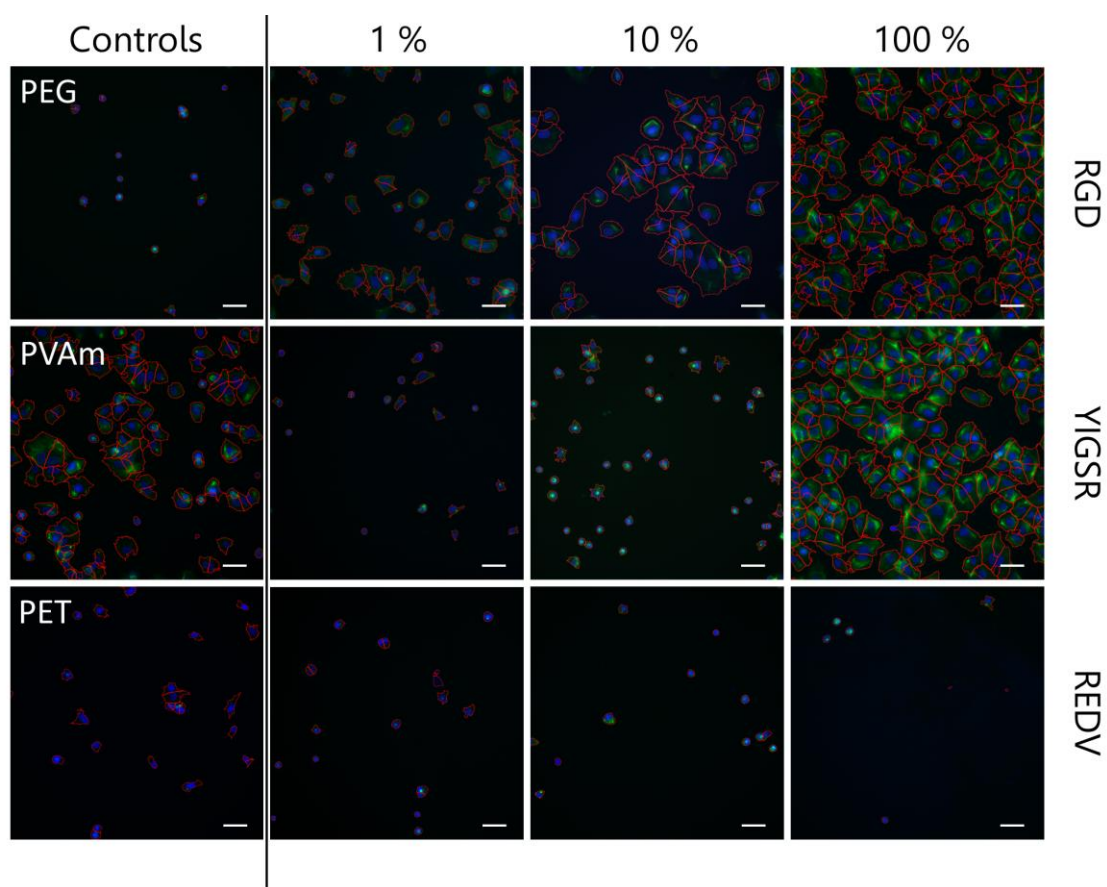


Figure annexe - 3 : Examples of images used to generate data from Figure 6. Nuclei and cells, as identified by the CellProfiler software, are outlined in blue and red, respectively. Scale bars represent 50 μm .

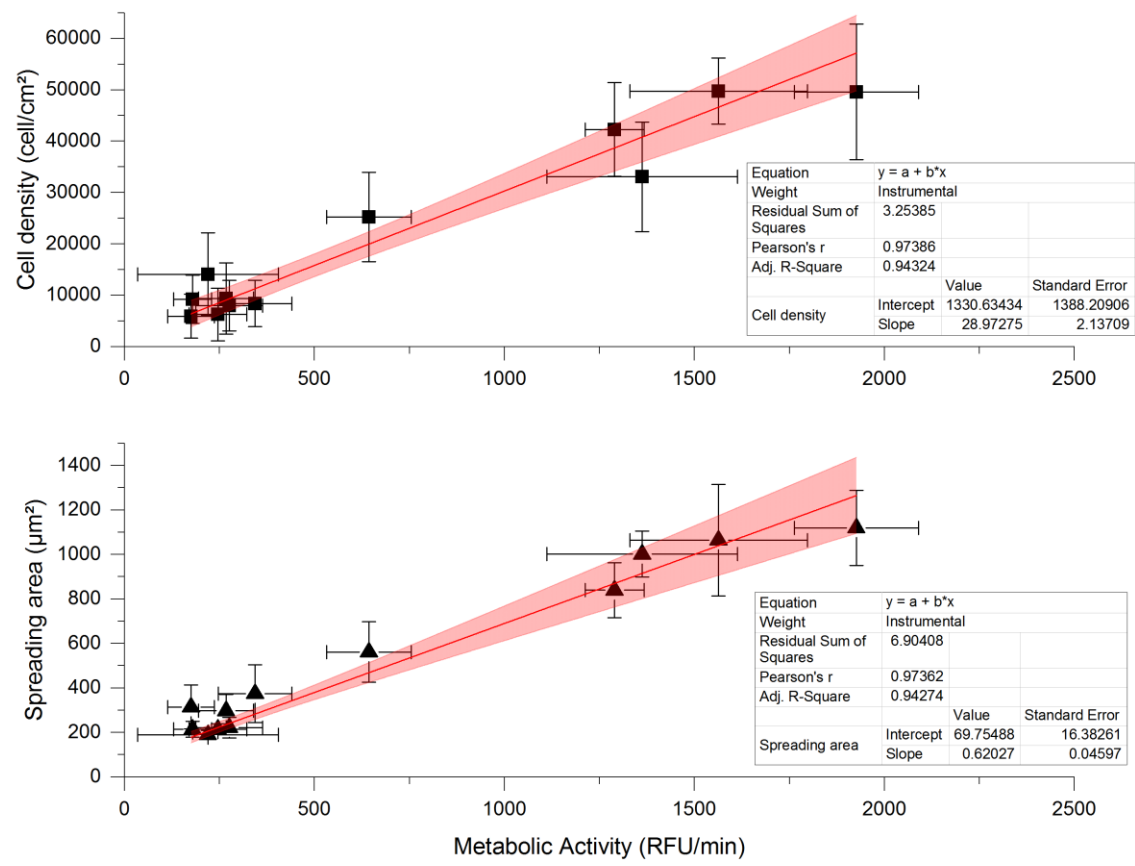


Figure annexe - 4 : Comparison of resazurin assay with cell density and spreading area.

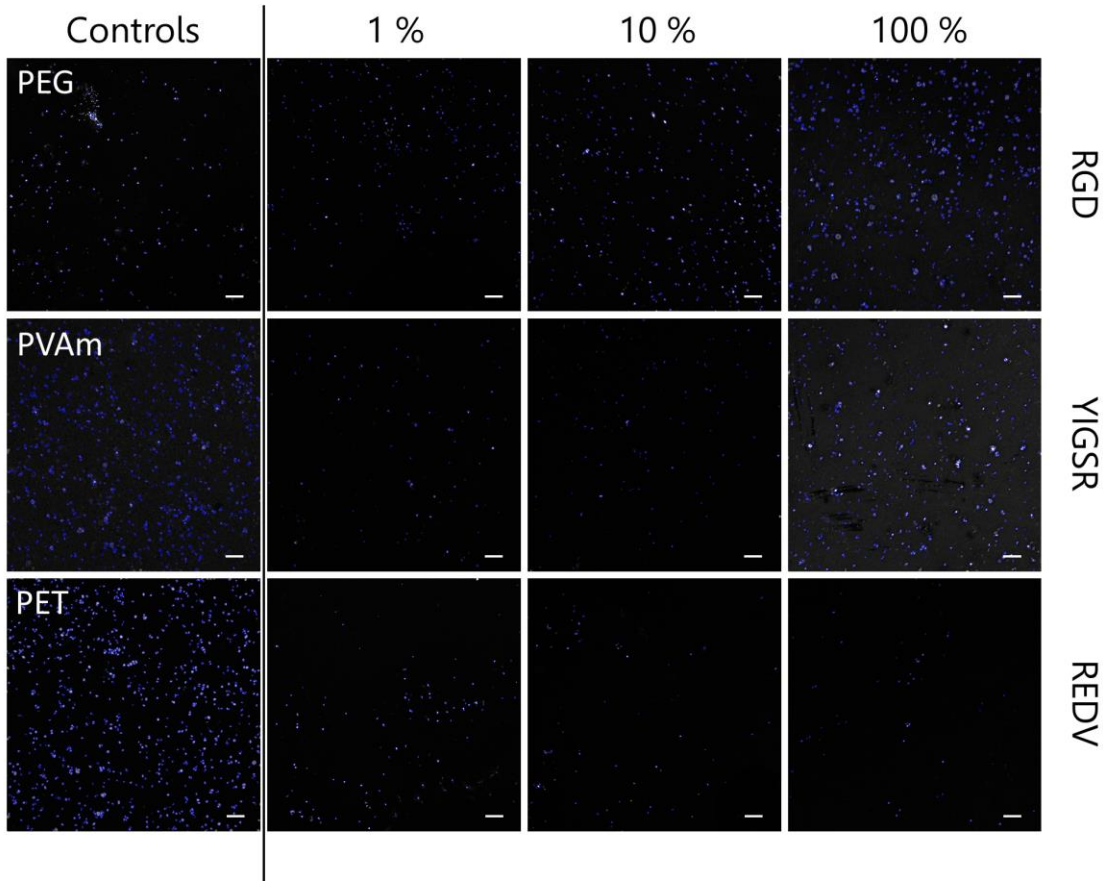


Figure annexe - 5 : Examples of images used to generate data from Figure 8. Platelets, as identified by the Cell Profiler software, are outlined in blue. Scale bars represent 50 μm.

ANNEXE C INFORMATIONS SUPPLÉMENTAIRES AU CHAPITRE 6

En plus des informations supplémentaires ci-dessous, des expériences visant au transfert du revêtement aux structures non-tissées sont présentées en Annexe E2.

C.1. Non publiées

Il est apparu pertinent au Chapitre 6 de quantifier la quantité de NO sécrétée par les HUVEC, et de l'éventuelle régulation de cette production induite par VEGF. Pour ce faire, le surnageant de culture a été récupéré à chaque changement de milieu du test de prolifération. Un protocole adapté de (Miranda et al., 2001) a été utilisé (*cf.* ci-dessous), pour détecter les deux produits de dégradation du NO – les nitrates (NO_3^-) et les nitrites (NO_2^-) – en utilisant la réaction de cette dernier avec le réactif de Griess.

Protocole : Les surnageants de culture étaient centrifugés pour retirer les éventuelles cellules et débris cellulaire (300 g, 5 min). Des 100 μL initialement présents dans les puits, 40 μL étaient utilisés pour détecter les nitrites (resp. nitrates). Dans le cas des nitrites, 50 μL de sulfanilamide (2% m/v dans HCl 5% v/v) et 50 μL de N-(1-Naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride (NEDD, 0.1% m/v dans H_2O) étaient simultanément ajoutés aux 40 μL d'échantillon ou de standard (nitrite de sodium) dilué dans du milieu. Après 30 min à 37°C, la plaque était lue en absorbance à 540 nm. La même procédure a été employée pour la détection des nitrates, à ceci près que 60 μL de chlorure de vanadium (III) (4 % m/v dans HCl 1N) étaient ajoutés en même temps que les autres réactifs pour réduire les nitrates en nitrites.

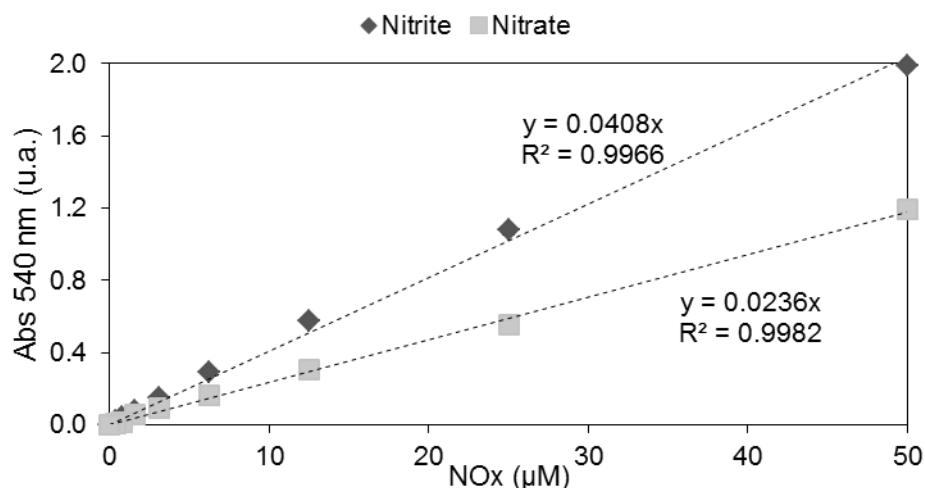


Figure annexe - 6 : Calibrations issues de la réaction des nitrites avec le réactif de Griess.

Malheureusement, aucun signal significatif n'a été mesuré dans aucun des surnageants de culture, pour toutes les conditions testées (milieu complet, VEGF soluble, VEGF greffé, *cf.* Figure 6-7A). Les surnageants ont été récoltés tous les deux jours jusqu'à jour 10 après un ensemencement à 15 000 cellules/cm², ainsi qu'à jour 2 après un ensemencement à 250 000 cellules/cm². Comme l'illustre la Figure annexe - 6, la limite de détection était de l'ordre de 0.5 µM de NOx, ce qui était probablement trop élevé. Notons que la quantité de NO produite par les HUVEC est rarement mesurée mais que (Z. L. Yang et al., 2012) rapportent une production de l'ordre de 2×10^{-3} µM/cellule en quelques heures après avec un ensemencement très élevé (500 000 cellules/cm²) assurant une monocouche confluente de cellules.

C.2. Publiées

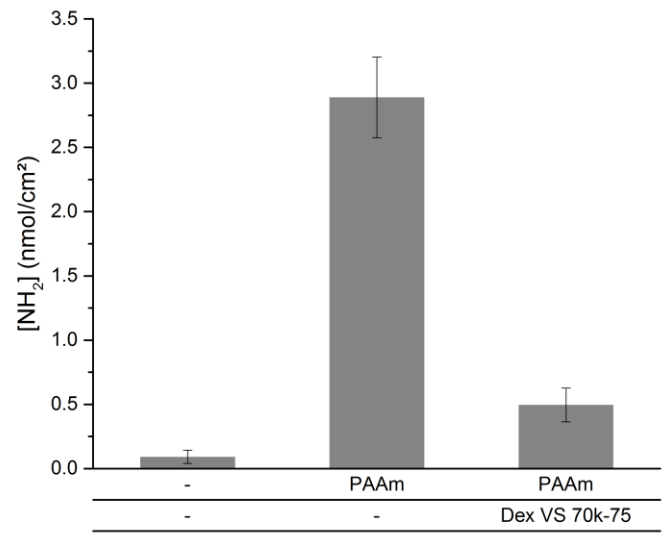


Figure annexe - 7 : Quantification of available amino groups on functionalized wells, as determined by an Orange II assay. (N = 3 × n = 4)

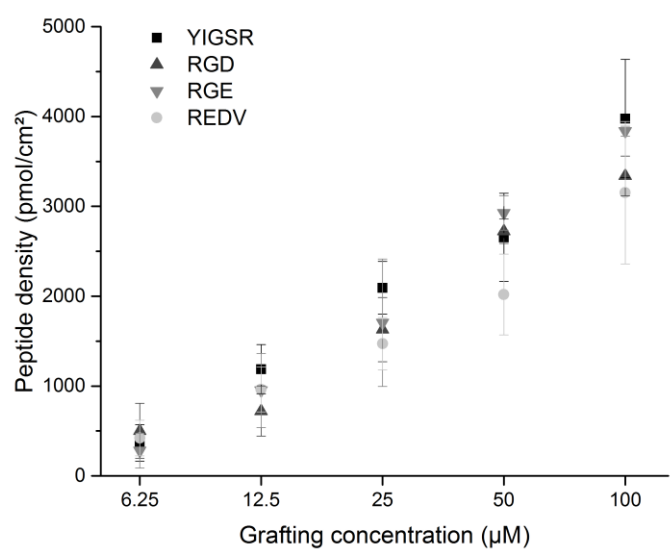


Figure annexe - 8 : Quantification of grafted peptide densities as determined by an indirect Ellman’s assay. (n =5)

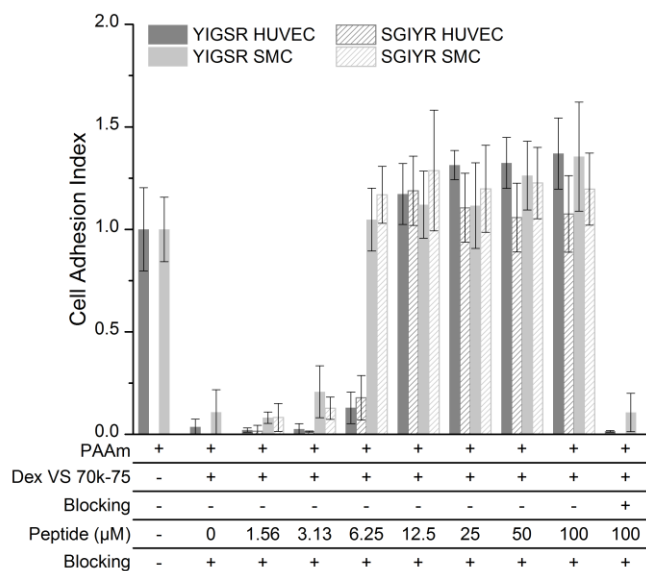


Figure annexe - 9 : HUVEC and AoSMC adhesion on YIGSR-functionalized wells. YIGSR and its control SGIYR were grafted onto wells covered with dextran-VS 70k-75. As specified in the x axis (table), a range of concentration going from 1.56 to 100 μM of peptide was used for the grafting step. A control was added with 100 μM of peptides incubated on top of pre-blocked dextran, to check for non-specific adsorption (rightmost columns on the figures). HUVEC and AoSMC adhesion were evaluated through a resazurin assay, which data were normalized to the adhesion level on PAAm-coated wells (without dextran). ($n=5$)

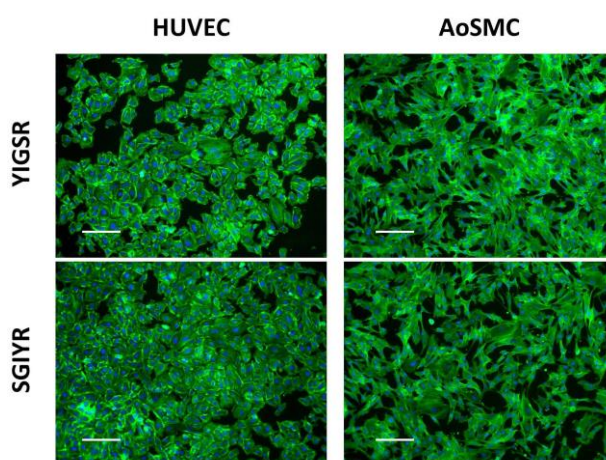


Figure annexe - 10 : HUVEC and AoSMC adhesion on YIGSR-functionalized wells. The images correspond to the results presented on **Figure annexe - 9** for peptides grafted at a concentration of 12.5 μM , leading to ca. 1 nmol/cm². Actin and nuclei staining are shown in green and blue, respectively. Scale bar represents 200 μm .

ANNEXE D GREFFAGE DES PEPTIDES ÉTIQUETÉS AVEC CYSTÉINE ET DÉFIS ASSOCIÉS POUR K5

Différents peptides d'adhésion (RGD, YIGSR, REDV et leurs contrôles), ainsi que le peptide K5, ont été immobilisés sur des surfaces dans le Chapitre 5 et le Chapitre 6. Dans tous les cas, les peptides étaient synthétisés avec une étiquette Cys-Gly-Gly, les dotant d'un unique thiol disponible pour le greffage spécifique (*cf.* partie 2.5.2.3) sur des substrats préalablement fonctionnalisés. Dans ce contexte, différentes fonctions ont été étudiées pour le recrutement des molécules thiolées, représentées à la Figure annexe - 12.

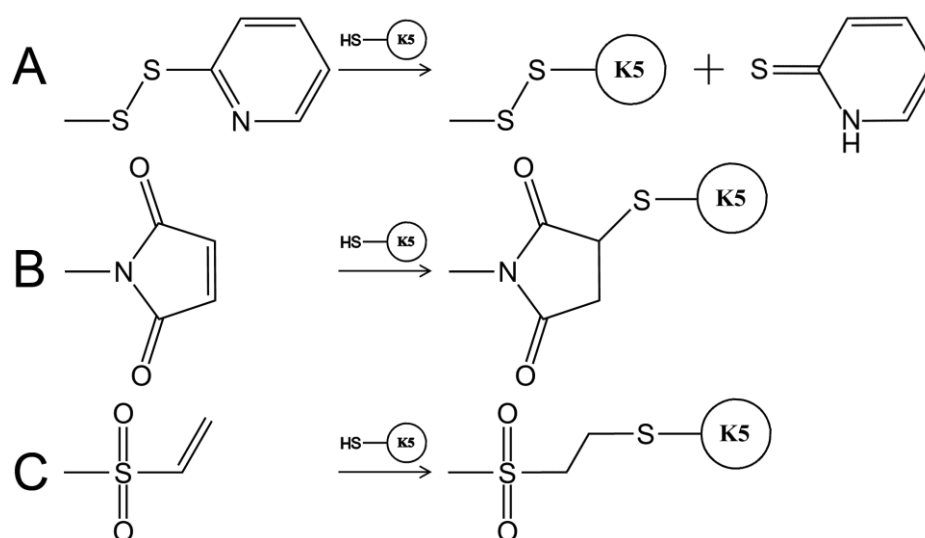


Figure annexe - 12 : Stratégies de greffage de peptides K5 étiquetés avec une cystéine (–SH) basées sur (A) la fonction oPSS ; (B) la fonction maléimide ou (C) la fonction vinylsulfone.

D.1. Greffage via oPSS et limitations pour K5

Le premier groupement envisagé au cours du Chapitre 5a été le groupement oPSS (Figure annexe - 12A), formant un pont disulfure avec le peptide (ici K5) en libérant un groupement 2-pyridinethiol (nommé Tpyr par la suite). L'avantage majeur de cette stratégie est la quantification directe de la réaction obtenue par mesure d'absorbance du groupement partant. Une optimisation des conditions de réaction a ainsi pu être menée. Sur la Figure annexe - 13, on observe un effet favorable de l'ajout d'éthanol dans le milieu de réaction. Le greffage de cystéine ici a été modélisé en suivant un modèle de réaction simple d'ordre 1 entre le groupement oPSS et le thiol. Le coefficient de réaction a ainsi pu être multiplié par environ 10 par l'ajout de 50% d'éthanol par rapport à 0%.

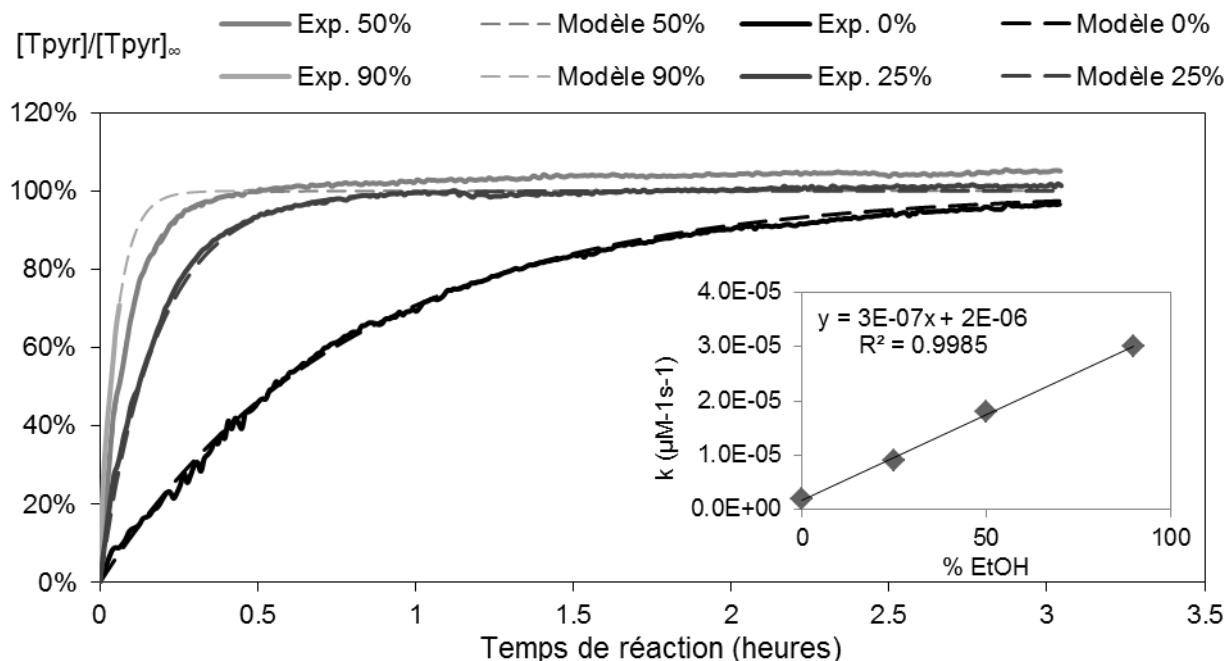


Figure annexe - 13 : Greffage de cystéine à 250 μM (excès) sur des films de PET fonctionnalisés avec du PVAm et un lien LC-SPDP (cf. protocoles du Chapitre 4). Le modèle utilisé est $d[Tpyr]/dt = k[Cys][oPSS]$. Le milieu de greffage était un mélange de PBS et d'éthanol (EtOH) au % v/v indiqué. La réaction dans 90% d'éthanol n'a pas été menée à terme du fait d'une précipitation de la Tpyr.

L'hypothèse proposée pour expliquer l'effet de l'éthanol sur la vitesse de réaction est la suivante : la molécule de LC-SPDP est majoritairement hydrophobe et est probablement mieux exposée dans le milieu contenant de l'éthanol, et donc plus accessible pour la réaction de greffage. Allant dans ce sens, l'effet de l'éthanol n'a pas été observé dans le cas de molécule hydrophile de PEG terminées par un oPSS (données non représentées). Par la suite, un mélange contenant 50% d'éthanol dans du PBS a été utilisé comme condition de réaction.

Différents peptides ont été greffés avec succès via cette stratégie (cf. Chapitre 5), contrairement au K5 comme l'illustre la Figure annexe - 14.

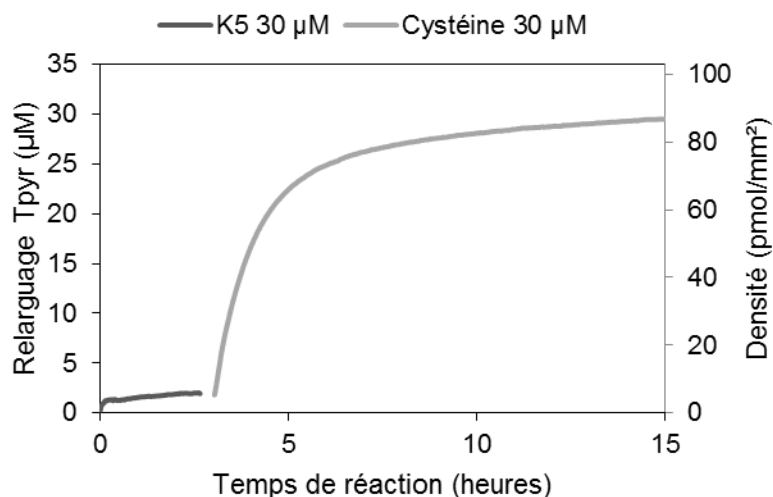


Figure annexe - 14 : Greffage du peptide K5 sur un film de PET fonctionnalisé avec du PVAm et du LC-SPDP (cf. protocoles du Chapitre 4). Après 3h de réaction, un greffage successif de cystéine à la même concentration a été mis en œuvre.

Après une confirmation de l'aptitude du K5 à réagir avec le LC-SPDP en solution (données non représentées), différentes hypothèses ont été posées pour expliquer l'échec du greffage de K5 sur les surfaces de PET fonctionnalisées.

- La première hypothèse a été une *répulsion électrostatique* entre le K5 et les NH_3^+ résiduels du PVAm. Des pH plus élevés ont été testés (jusqu'à pH 11), ainsi qu'un ajout d'une forte concentration de sel (1 M NaCl), en vain. Enfin, l'échec similaire du greffage du peptide E5 a fini par invalider l'hypothèse électrostatique.
- La seconde hypothèse était que, quelle qu'en soit la raison (cinétique, stérique, etc.), *le greffage de K5 était faible et indétectable* par la mesure du relargage de Tpyr. Des tests ELISA quantifiant la capture de protéines étiquetées E5 (telles que E5-EGF) confirmaient indirectement l'absence de K5 greffé. En effet, la quantité de protéines présentes dans le surnageant à la fin de la réaction (ELISA indirect) n'indiquait pas de différence avec la solution mère. De même, en procédant à l'ELISA directement sur la surface, il n'y avait pas de différence avec les contrôles et le rendement de capture, spécifique ou non, était de l'ordre de 0.01 % ou moins.
- Enfin, l'hypothèse de *l'oxydation du K5*, formant des dimères en solution liés par des ponts disulfure, a été émise. Des mesures de la quantité de thiol libre (test Ellman, cf. Chapitre 5)

ont ainsi été menées pour des solutions de K5 laissés à température ambiante pendant plusieurs heures (Figure annexe - 15). Plus de la moitié des thiols libres avait ainsi disparu au bout de 150 min, démontrant une forte tendance à l'oxydation du K5. À titre indicatif, plus de 95% des thiols de CGGRGD restent libres après 24h à pH 7,4.

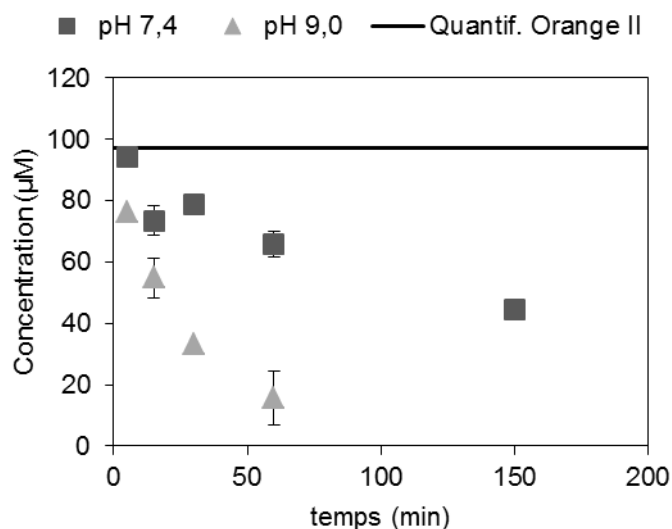


Figure annexe - 15 : Quantité de thiols libres sur K5 en fonction du temps. La mesure est faite par un test Ellman au temps et pH indiqués.

Suite à cette observation, quelques modifications du protocole ont été tentées pour le greffage du K5 sur le PET fonctionnalisés (ajout d'EDTA 1 mM, pH plus acide) mais sans succès. Les modifications apportées au protocole étaient limitées du fait que le greffage du K5 et la réaction parasite de dimérisation impliquaient toutes deux la formation d'un pont disulfure : chercher à empêcher l'oxydation allait inévitablement affecter négativement la réaction de greffage.

D'autre part, une seconde limitation au cœur de la stratégie oPSS est liée à l'instabilité du lien formé. Le pont disulfure peut en effet facilement être rompu en conditions réductrices mais aussi par échange de disulfure. Une autre cystéine peut ainsi aisément venir rompre le lien covalent (Bai et al., 2004). Ainsi, en plus d'être inapproprié pour un usage *in vivo*, la stratégie oPSS limite les possibilités de co-immobilisation successives et empêche le blocage subséquent des sites non réagis avec une solution de cystéine par exemple. C'est pourquoi lors du Chapitre 5, les peptides étaient greffés en les diluant dans une solution de peptide contrôle, pour obtenir une concentration totale fixe de peptide, suffisante pour bloquer tous les sites.

D.2. Alternatives explorées

L'idée de modifier le K5, en solution, avec un groupement oPSS a été considérée (Figure annexe - 16). Cette stratégie permettrait à la fois de protéger le K5 de la dimérisation en solution (une fois le mélange purifié) et de greffer le K5 sur une surface fonctionnalisée avec des thiols libres (par exemple un LC-SPDP débarrassé de son groupement oPSS par réduction). L'idée était ingénieuse mais amenait des étapes supplémentaires de production/purification du K5 et a été rapidement écartée car elle restait basée sur la formation de ponts disulfure.

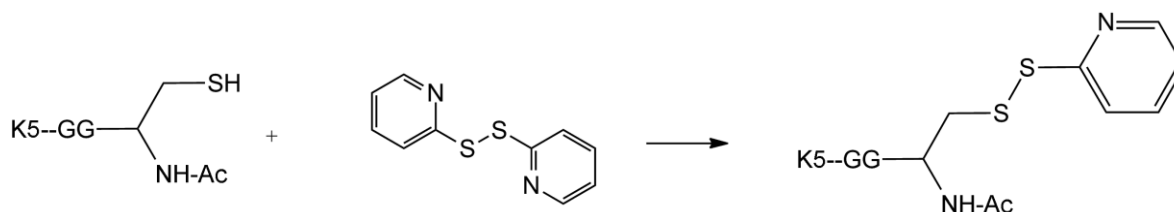


Figure annexe - 16 : Modification du K5 avec un groupement oPSS.

Il existe deux principales fonctions alternatives pour le greffage de molécules thiolées sur une surface : la fonction maléimide (Figure annexe - 12B) et la fonction vinylsulfone (Figure annexe - 12C). Elles ont toutes deux l'avantage de former un lien covalent thioéther, plus stable qu'un pont disulfure. Le désavantage est leur manque de spécificité : ces groupements sont également capables de réagir avec tous les groupements nucléophiles (thiol, amines, hydroxyls) dépendamment du pH de la réaction (López Jaramillo et al., 2012; Morpurgo, Veronese, Kachensky, & Harris, 1996). Notons que le K5 contient 10 amines primaires sur ses résidus Lys contre un thiol sur son résidu Cys, mais que le pKa des amines des Lys est néanmoins relativement élevée (pKa = 10,5) par rapport à celui des thiols des Cys (pKa = 8,3), avec lesquels la réaction est beaucoup plus rapide à pH 8 et inférieur (Morpurgo et al., 1996).

Notre attention s'est alors portée sur le TCEP, un agent réducteur ne contenant pas de thiol (contrairement au DTT et au mercaptoéthanol), pouvant *a priori* être introduit pendant la réaction avec les fonctions maléimide ou vinylsulfone. Certains groupes observent néanmoins une réaction parasite avec le maléimide (Shafer, Inman, & Lees, 2000), ce qui nous a fait écarter cette fonction au profit du vinylsulfone. Cette dernière a de plus un avantage de stabilité en milieu aqueux.

Les espaceurs avec fonction vinylsulfone sont moins répandus dans le commerce et nous avons donc opté par une modification du LC-SPDP une fois greffé (Figure annexe - 17). En bref, une fois

le LC-SPDP greffé, celui-ci était réduit puis doté d'une fonction vinylsulfone par greffage de divinylsulfone (DVS). Le peptide K5 ou la cystéine étaient alors greffés en présence de TCEP.

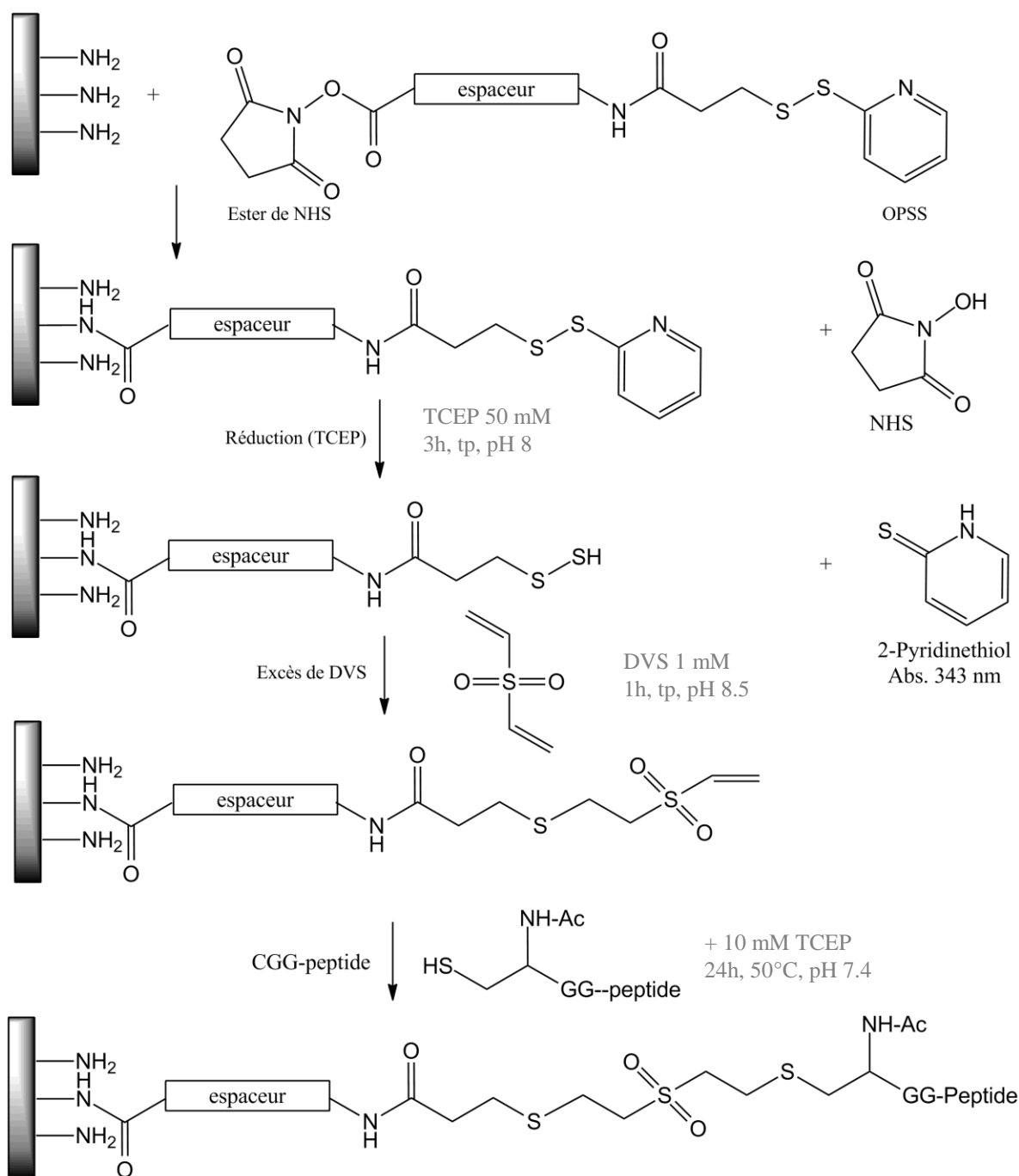


Figure annexe - 17 : Stratégie SPDP-DVS : conversion de la fonction oPSS en fonction VS.

Bien que le greffage du K5 ne puisse être directement quantifié ici (pas de groupement partant, cf. Figure annexe - 12), la capture sélective de protéines étiquetées avec E5 a pu être observée (Figure annexe - 18).

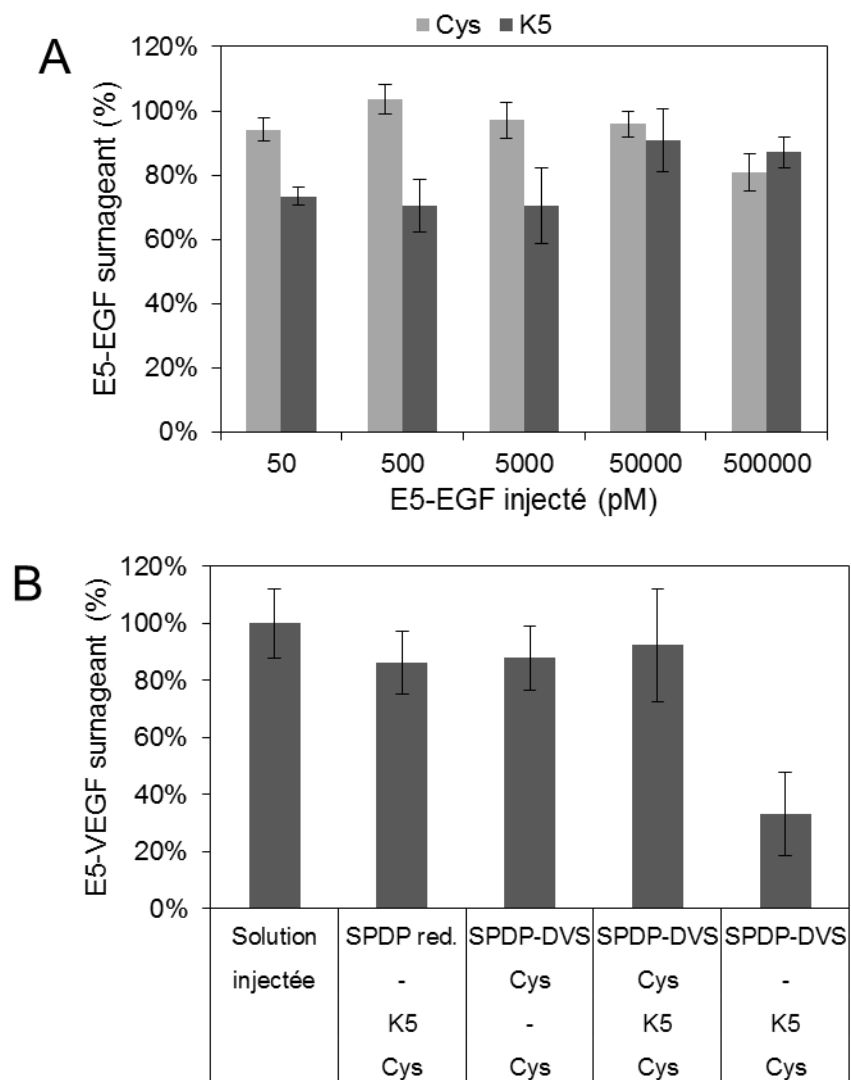


Figure annexe - 18 : Greffage de protéines étiquetées E5 sur structures de PET (fibres) fonctionnalisées avec K5 via la stratégie SPDP-DVS (cf. Figure annexe - 17). La quantité de protéines dans le surnageant a été déterminée par ELISA (indirect). (A) Greffage de E5-EGF. La condition « Cys » correspond à la 3^{ème} condition de la figure B, c'est-à-dire sans K5, tandis que la condition K5 correspond à la 5^{ème} condition de la figure B. (B) Greffage de E5-VEGF à 100 pM. Plusieurs contrôles supplémentaires sont ajoutés par rapport à la figure A. L'ajout de cystéine (Cys) vise à bloquer les sites VS actifs.

Pour limiter les coûts associés à l'utilisation d'espaceurs bifonctionnels (LC-SPDP ou PEG-SPDP), entre autres raisons, la fonction VS a été ajoutée au dextrane (dex-VS) lors du Chapitre 6. La fonction VS a été utilisée pour le greffage à la fois de peptides d'adhésion et du K5, avec succès. Notons néanmoins que le TCEP n'a pas été utilisé lors du greffage au Chapitre 6 du fait de la présence d'une réaction parasite entre le TCEP et le VS, absente de la littérature à notre connaissance, et observée plus tard par un collègue lors de réactions en solution entre le dex-VS et la cystéamine (Figure annexe - 19, disparition des pics du VS entre 6.5 et 7.5 ppm (symbole bleu vs symbole rouge)).

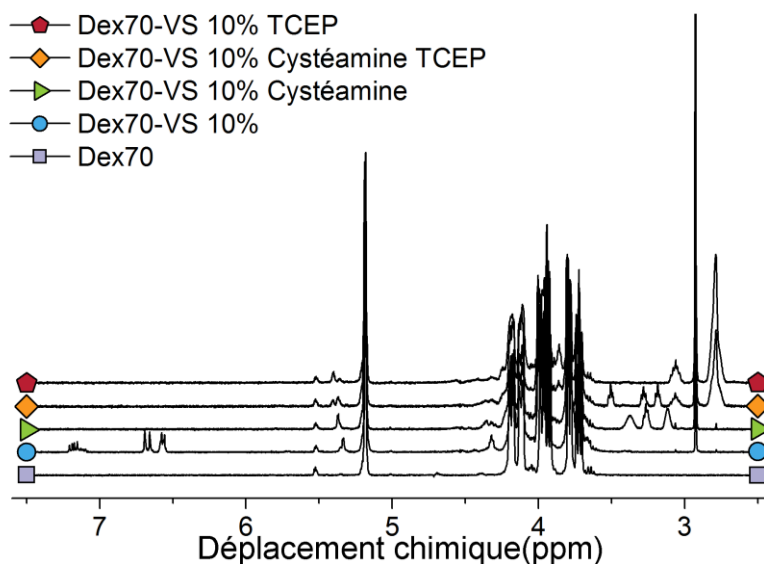


Figure annexe - 19 : Réaction parasite entre le dex-VS et TCEP.

ANNEXE E TRANSFERT AUX STRUCTURES NON TISSÉES

E.1. Transfert du revêtement développé au Chapitre 5

Le greffage de peptides a pu être aisément transféré aux structures de PET fibreuses, à ceci près que de plus grandes quantités de peptides étaient nécessaires du fait de la plus grande surface efficace (Figure annexe - 20). À titre indicatif, 4 $\mu\text{mol/g}$ représentent environ 6 000 pmol/cm^2 apparents, c'est-à-dire 3 fois au-dessus du maximum obtenus pour les films de PET au Chapitre 5 (Tableau 5-2). Un blocage avec la cystéine a été opéré ici pour bloquer les sites oPSS restants, car tous n'étaient pas accessibles aux peptides dans cette structure tridimensionnelle. La somme des quantités de Tpyr relarguées lors du greffage de peptides et lors du blocage à la cystéine était la même dans tous les cas et correspond à la quantité totale de PEG-SPDP.

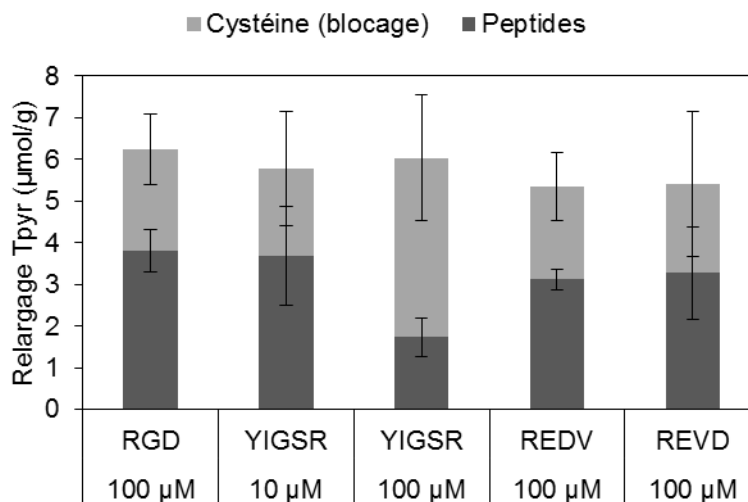


Figure annexe - 20 : Greffage de peptides sur structures de PET fonctionnalisées avec PEG-SPDP.

Concernant l'adhésion des HUVEC sur ces surfaces, plusieurs résultats surprenants ont été obtenus (Figure annexe - 21):

- Les HUVEC n'adhéraient pas plus sur les structures aminées avec le PVAm que sur les structures de PET nues (colonnes 1 vs 2). Cette observation récurrente est restée sans explication et démontre les limites de l'utilisation de surfaces modèles.
- L'ajout de PEG n'a pas eu d'effet sur l'adhésion cellulaire, ce qui est probablement corrélé d'une part à la remarque précédente, et d'autre part à une mauvaise couverture des surfaces

par le PEG. La quantité d'espaceur PEG utilisé pour le greffage étant déjà relativement élevée, elle ne pouvait pas être significativement augmentée pour des raisons de coût. C'est une des raisons qui ont orienté l'étude vers le dextrane au Chapitre 6.

- À la plus forte densité testée, seul RGD a permis d'augmenter significativement l'adhésion cellulaire, sans toutefois que son effet soit aussi important que sur les films (seulement +50% ici contre + 900% sur les films au Chapitre 5 (Figure 5-5)). Ceci est corrélé aux remarques précédentes : sans l'effet *low-fouling* du PEG, le gain ne peut pas être si important. De plus, comme mentionné en Annexe D, le blocage nécessaire à la cystéine a pu déplacer certains peptides préalablement greffés.

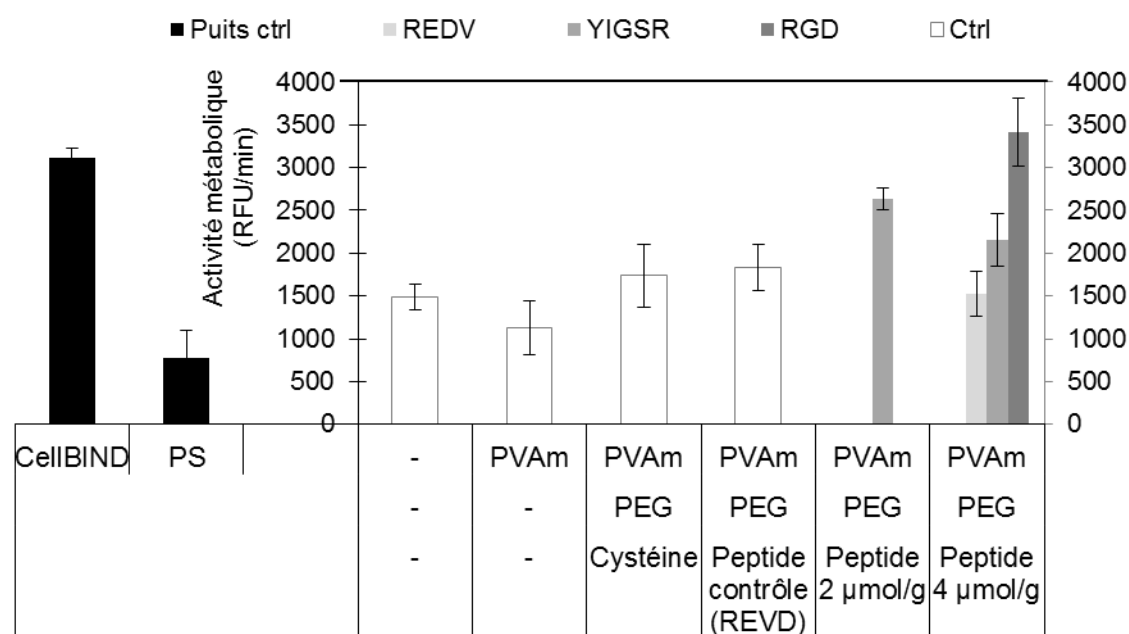


Figure annexe - 21 : Adhésion des HUVEC sur des structures de PET fonctionnalisées avec des peptides d'adhésion. L'adhésion sur des puits de culture en polystyrène traité (CellBIND) ou non (PS) est montrée à titre informatif.

E.2. Transfert du revêtement développé au Chapitre 6

Le dextrane-VS sélectionné au Chapitre 6 (70k-75) a pu être greffé aux films de PET ainsi qu'aux structures non-tissées (fibres), préalablement fonctionnalisées avec le PAAm. La Figure annexe - 22 correspond à la Figure annexe - 7 pour les plaques à puits couvertes de PAAm. On y retrouve la diminution de la quantité d'amines initiales, indiquant le greffage du dex-VS.

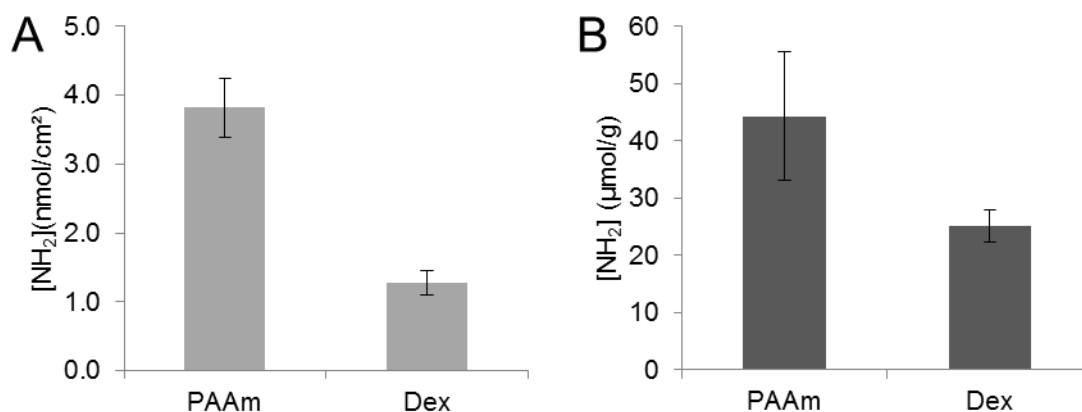


Figure annexe - 22 : Greffage de Dex-VS 70k-75 sur (A) films et (B) fibres de PET préalablement fonctionnalisées avec du PAAm. La quantité d'amines a été déterminée par un test Orange II.

La caractérisation des étapes suivantes de greffage a été menée sur les films et les fibres de PET, en commençant par le greffage de peptides RGD (Figure annexe - 23). Le greffage était légèrement plus efficace sur les fibres, probablement du fait d'une plus grande aire spécifique.

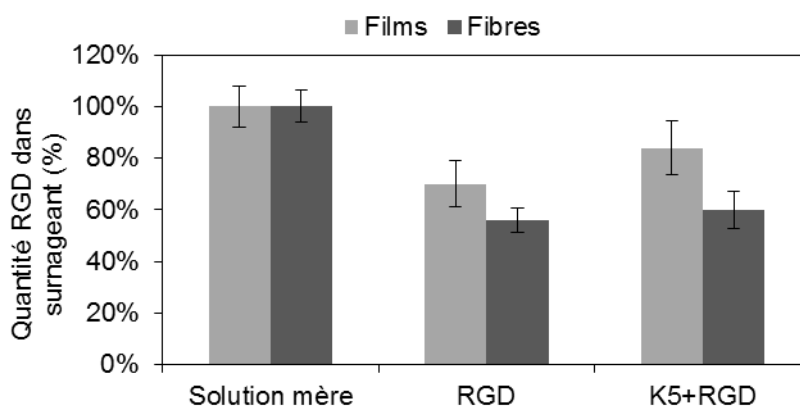


Figure annexe - 23 : Quantification de la quantité de RGD dans le surnageant de réaction par un test Ellman.

La co-immobilisation de K5 et RGD, ainsi que la capture subséquence de E5-VEGF, a été caractérisée par ELISA direct (Figure annexe - 24-A) et indirect (Figure annexe - 24-B), similairement au Chapitre 6 sur les plaques à puits (Figure 6-6).

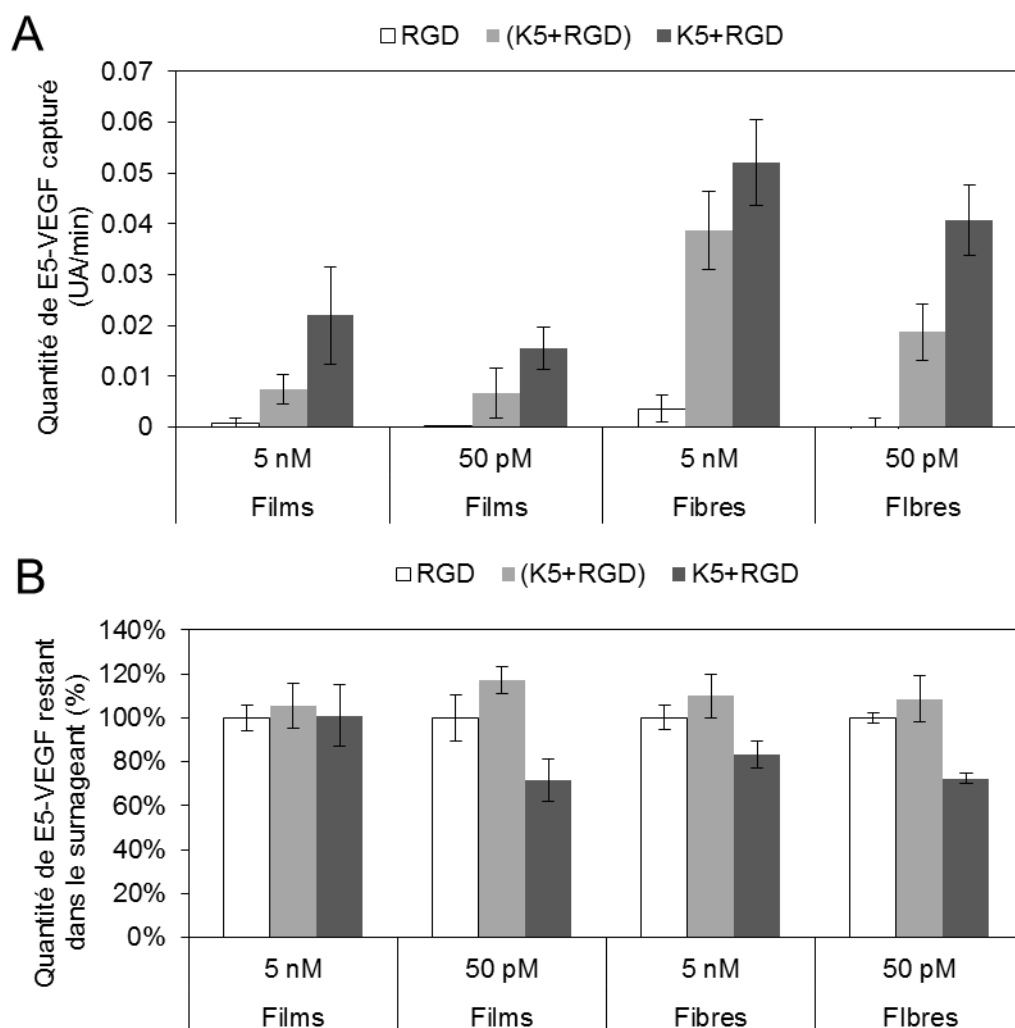


Figure annexe - 24 : Capture de E5-VEGF sur films et fibres fonctionnalisées avec K5, RGD ou les deux, caractérisée par (A) ELISA direct et (B) ELISA indirect. Les surfaces étaient des disques de 1 cm de diamètre, placées dans des plaques 48 puits en PS durant l'expérience, et recouvertes avec 500 μ L de solution de E5-VEGF à 5 nM ou 50 pM dans du FBS 10%. Le protocole complet est similaire à celui décrit pour les plaques à 96 puits fonctionnalisées au Chapitre 6. La condition (K5+RGD) correspond au cas où les fonctions VS du dextrane étaient pré-bloquées et représente donc l'adsorption non-spécifique des peptides.

Similairement aux résultats obtenus sur les plaques à puits, la capture de E5-VEGF s'est avérée spécifique à la présence de K5 (barres blanches, Figure annexe - 24A). De même, une partie du K5 s'adsorbe de manière non spécifique et est capable de recruter E5-VEGF (barres gris clair, Figure annexe - 24A). Ce recrutement est néanmoins toujours plus faible que lorsque K5 était greffé de manière covalente (barres gris foncé, Figure annexe - 24A). La capture de E5-VEGF était plus efficace sur les fibres que sur les films, certainement du fait de la plus grande aire spécifique ici encore.

Les résultats de l'ELISA indirect indiquent que la quantité de E5-VEGF recruté par le K5 adsorbé était négligeable, conclusion similaire à celle obtenue sur les plaques à puits au Chapitre 6. La capture de E5-VEGF sur les surfaces où K5 était greffé de manière covalente était quant à elle significative, sauf dans le cas des films mis en contact avec 5 nM de E5-VEGF. Similairement aux plaques à puits, ces surfaces planes étaient probablement saturées à cette concentration.